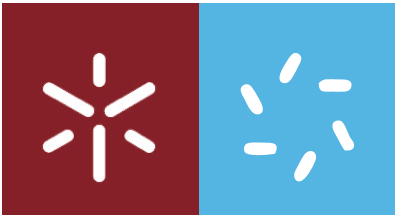




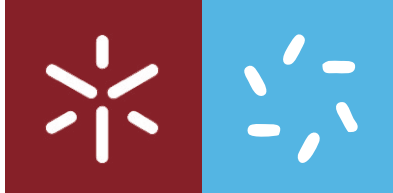
Ana Rita dos Santos Lopes Carvalho

**Avaliação da qualidade ecológica de um troço eutrofizado e potencial dos fungos para a biorremediação**

**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências







**Universidade do Minho**

Escola de Ciências

Ana Rita dos Santos Lopes Carvalho

**Avaliação da qualidade ecológica de um  
troço eutrofizado e potencial dos fungos  
para a biorremediação**

Tese de Mestrado  
Mestrado em Ecologia

Trabalho efetuado sob a orientação da  
**Professora Doutora Maria Cláudia Gonçalves  
Cunha Pascoal**

e sob co-orientação da  
**Professora Doutora Fernanda Maria Fraga  
Mimoso Gouveia Cássio**

Abril 2017

## **Declaração**

**Nome:** Ana Rita dos Santos Lopes Carvalho

**Endereço eletrónico:** [ritaslc@hotmail.com](mailto:ritaslc@hotmail.com)

**Cartão de cidadão:** 14166027 9 ZZ7

**Título da dissertação:** Avaliação da qualidade ecológica de um troço urbanizado e potencial dos fungos para a biorremediação

**Orientadora:** Professora Doutora Maria Cláudia Gonçalves Cunha Pascoal

**Co-orientadora:** Professora Doutora Fernanda Maria Fraga Mimoso Gouveia Cássio

**Ano de conclusão:** 2017

**Designação do Metrado:** Ecologia

**É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE**

Universidade do Minho, 28 Abril de 2017

---

(Ana Carvalho)

## **Agradecimentos**

Quero agradecer às Professoras Doutoras Fernanda Cássio e Cláudia Pascoal, pela forma como me receberam no seu grupo, por todo o conhecimento transmitido e pelas palavras de incentivo ao longo desta jornada.

Agradecer também à Isabel Fernandes por toda a paciência, por todo o conhecimento transmitido, por todos os “puxões de orelhas” e por estar sempre disponível para tudo mesmo quando as “caloiras” fizeram asneiras.

Não poderia de deixar de prestar um agradecimento a todo o grupo de trabalho que tão bem me recebeu e sempre me prestou auxílio durante a minha estadia no laboratório.

A todos os técnicos, principalmente ao Sr. Luís por toda a paciência, por todo o trabalho que teve comigo e pelas palavras de incentivo quando as coisas não correram bem.

Às Ritas como não poderia deixar de ser, companheiras de mestrado e de laboratório, agradeço por todos os bons momentos e pela amizade. Especialmente agradecer à Rita R, por toda ajuda prestada em todos os momentos, pelas horas de carro passadas a fazer de motorista e pela paciência por me “aturar” quando diluir o branco parece uma boa ideia. À Martinha claro, por toda ajuda, pela amizade, pelas tardes em Agosto no departamento e por outras coisas que não posso contar aqui....

Um muito obrigada por tudo meninas!

Aos meus amigos por todo o incentivo e por nunca desistirem e acreditarem mesmo quando eu já dei o “jogo” quase como perdido.

À minha mãe e ao meu irmão, por todas as palavras de incentivo, por nunca me fazerem desistir e pelos valores transmitidos que me tornaram na pessoa que sou hoje.



## Resumo

A água é um bem essencial à vida e, como tal, deve ser mantida em boas condições. No entanto, devido ao desenvolvimento da indústria e práticas de má gestão, este recurso tem vindo a sofrer um declínio na sua qualidade. Os rios são coletores naturais das paisagens, refletem o uso e a ocupação do solo e da sua bacia de drenagem.

Os macroinvertebrados bentónicos são organismos muito usados como bioindicadores da qualidade ecológica da água dos rios devido às características que possuem, tais como a duração do ciclo de vida e do ciclo reprodutivo, a fisiologia, o comportamento alimentar e a capacidade de dispersão. Alterações no meio ambiente podem afetar a dinâmica das populações, por induzir mudanças na composição em espécies, na riqueza e na abundância e, deste modo, afetar as propriedades e as funções do ecossistema em que se inserem.

Foi feito um estudo de qualidade de água no rio Este na cidade de Braga em duas estações do ano (Inverno 2015 e Verão 2016) em três pontos ao longo do rio (S. Pedro de Este, Rodovia e Delphi). Foram analisados parâmetros físico-químicos e aplicadas métricas biológicas de modo a verificar a abundância e riqueza em taxa no período de tempo de amostragem. Assim, foi possível classificar a água nos diferentes locais de acordo com a sua qualidade ecológica.

Este estudo permitiu concluir que o rio Este, antes de atravessar a cidade de Braga, apresentava uma qualidade ecológica moderada (S. Pedro de Este). À medida que o rio atravessava a cidade, verificou-se uma degradação da qualidade da água (Rodovia e Delphi). Os resultados dos três índices bióticos indicaram que a qualidade da água estava deteriorada essencialmente nesses locais, apesar dos esforços de recuperação já efetuados pela Câmara Municipal de Braga nos últimos anos.

Como medida de biorremediação, principalmente nos locais onde a poluição estava relacionada com o excesso de nutrientes, foi testado o potencial de uma cultura de um fungo aquático de *Articulospora tetracladia* para a remoção de concentrações elevadas de nutrientes na água (0,5; 10; 25; 50; 100 mg/L N-NO<sub>3</sub> e 20 mg/L P-PO<sub>4</sub>), durante 15 dias, e usando como substrato de colonização folhas de carvalho e de plátano. Foi quantificada a perda de massa foliar, a biomassa de fungos e a imobilização de nutrientes. Ao fim de 10 dias de experiência, para concentrações intermédias de azoto testadas (10 e 50 mg/L N-NO<sub>3</sub>), a cultura removeu 100% dos nutrientes da água. Aos 15 dias os fungos já estavam na fase de mineralização. Assim, os nossos resultados sugerem que os fungos podem ser usados em processos de biorremediação de rios eutrofizados.





## Abstract

Water is an essential good to life and, therefore, it should be kept in good conditions. However, due to the industry development and poor management practices, this resource has been suffering a decline in its quality. Rivers are natural collectors of landscapes, reflecting the use and occupation of the soil, and its drainage basin.

Aquatic benthic macroinvertebrates are widely used as bioindicators of ecological quality of rivers and streams, due to several reasons, such as the duration of the life cycle and reproductive cycle, physiology, feeding behavior and dispersal ability. Changes in the environment can affect the dynamics of population, by inducing changes in species composition, species richness and abundance, and thus affecting the properties and functions of the ecosystem in which they occur.

We assessed the water quality of an urbanized reach of the Este river in the city of Braga, in two seasons (Winter 2015 and Summer 2016), at three sampling sites along the river (S. Pedro de Este, Rodovia and Delphi). Physical and chemical parameters as well as biological metrics were analyzed to quantify species abundance and taxon richness in the sampling time period. Thus, it was possible to classify the water quality at different sites according to its ecological quality.

We concluded that the Este river, upstream the city of Braga, had a moderate ecological quality (S. Pedro de Este). As the river crosses the city, there was degradation of water quality (Rodovia and Delphi). The results of the three biotic indexes indicate that the water quality and ecological status were compromised at all these sites, despite the recovery efforts already carried out by the City Hall of Braga over the last years.

As a measure of bioremediation, mainly at sites where pollution was related to the excess of nutrients, we tested the potential of a culture of the aquatic fungi *Articulospora tetracladia* for the removal of nutrients in the water (0,5; 10; 25; 50; 100 mg/L N-NO<sub>3</sub> and 20 mg/L P-PO<sub>4</sub>), for 15 days, and using oak and plane tree leaves as substrate for colonization. Leaf mass loss, fungal biomass and nutrients immobilization were quantified. After 10 days, intermediate tested levels of nitrogen (10 and 50 mg/L N-NO<sub>3</sub>), **were** 100% removed from the water. After 15 days, the fungi were already in the mineralization phase. Thus, our results suggest that fungi can be used for bioremediation of eutrophic rivers and streams.



## Índice

<b>Declaração .....</b>	<b>ii</b>
<b>Agradecimentos .....</b>	<b>iii</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>v</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>vii</b>
<b>Índice de figuras .....</b>	<b>xi</b>
<b>Lista de tabelas .....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. Avaliação da qualidade ecológica da água do rio Este (Braga-Portugal) .....</b>	<b>1</b>
1.1. Introdução .....	3
1.1.1. Indicadores da integridade ecológica .....	4
1.1.2. Macroinvertebrados bentónicos como indicadores ecológicos .....	6
Objetivos .....	8
1.2. Material e Métodos .....	9
1.2.1. Área de estudo .....	9
1.2.2. Procedimento de amostragem.....	12
1.2.3. Parâmetros físico-químicos da água .....	16
1.2.5. Macroinvertebrados bentónicos.....	17
1.2.6. Tratamento de dados.....	19
1.3. Resultados e Discussão .....	22
1.3.1. Parâmetros físico-químicos e qualidade do bosque ribeirinho.....	22
1.3.2. Comunidades de macroinvertebrados bentónicos .....	27
1.3.3. Índices bióticos .....	31
1.3.4. Grupos Tróficos.....	34
<b>2. Potencial de remediação de águas eutrofizadas por fungos aquáticos.....</b>	<b>38</b>
2.1. Introdução .....	40
2.1.1. Estado ecológico das massas de água.....	40
2.1.2. Os nutrientes e a eutrofização.....	41
2.1.3. Os fungos aquáticos e os nutrientes dissolvidos na água .....	43
2.1.4. Objetivos.....	45
2.2. Metodologia .....	46
2.2.1. Preparação das folhas .....	46
2.2.2. Preparação dos microcosmos.....	46
2.2.3. Decomposição da folhada.....	48
2.2.4. Biomassa de Fungos .....	48

2.2.5.	Quantificação dos nutrientes nas folhas .....	49
2.2.6.	Análise estatística de dados .....	49
2.3.	Resultados e Discussão .....	50
2.3.1.	Perda de massa da folhada:.....	50
2.3.2.	Biomassa de Fungos .....	52
2.3.3.	Dinâmica de nutrientes .....	54
<b>3.</b>	<b>Considerações Finais.....</b>	<b>58</b>
<b>4.</b>	<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>64</b>
<b>Anexos.....</b>		<b>74</b>

## Índice de figuras

<i>Figura 1: Funções desempenhadas pelos rios no meio-físico em que se inserem. [adaptado: Francisco &amp; Silva, 2007]</i> .....	4
<i>Figura 2: Integridade Ecológica e seus elementos: Integridade Física, Química e Biológica. [adaptado de (Michael T Barbour et al., 2000)]</i> .....	5
<i>Figura 3: Representação da bacia hidrográfica do Ave e sua área de ocupação. [adaptado: Francisco &amp; Silva, 2007]</i> .....	11
<i>Figura 4: Localização dos pontos de amostragem no rio Este (Mapa feito em QGIS – Sistema de Georreferenciamento)</i> .....	14
<i>Figura 5: Locais de amostragem: A -S. Pedro de Este, B- Rodovia, C- Delphi</i> .....	15
<i>Figura 6: Recolha de macroinvertebrados com rede de mão</i> .....	17
<i>Figura 7: Exemplares de macroinvertebrados amostrados nos três pontos de recolha</i> .....	18
<i>Figura 8: Análise de componentes principais (PCA) para os três locais em estudo no Inverno de 2015. Sit1- S. Pedro de Este; sit2- Rodovia; sit3- Delphi</i> .....	25
<i>Figura 9: Análise de componentes principais (PCA) para os três locais de amostragem no Verão de 2016. sit1- S<sup>a</sup> Pedro de Este; sit2- Rodovia; sit3- Delphi</i> .....	26
<i>Figura 10: Percentagem de famílias recolhidas em cada ponto de amostragem para o período de tempo em estudo (Inverno 2015 e Verão 2016)</i> .....	29
<i>Figura 11: Variação do índice de Shannon (H') das comunidades de macroinvertebrados do rio Este no Inverno de 2015 e no Verão de 2016</i> .....	30
<i>Figura 12: Variação do índice de Pielou (J') das comunidades de macroinvertebrados do rio Este no Inverno de 2015 e no Verão de 2016</i> .....	31
<i>Figura 13: Grupos tróficos (%) presente em cada local de amostragem no Inverno de 2015</i> .....	34
<i>Figura 14: Grupos tróficos (%) presentes em cada local de amostragem no Verão de 2016</i> .....	35
<i>Figura 15: Placas de cultura de Articulospora tetracladia (A), Homogeneização do inóculo de fungo (B)</i> .....	47
<i>Figura 16: Troca de meios realizados em ambiente estéril</i> .....	48
<i>Figura 18: Perda de massa foliar ao longo de 15 dias de experiência em microcosmos com folhas de plátano (Platanus sp.) inoculadas com o fungo A. Tetracladia na presença de concentrações crescentes de N-NO<sub>3</sub>. Os símbolos representam as cinco concentrações (mg/L) testadas (0,5;10;25;-;50 e 100</i> .....	51
<i>Figura 17: Perda de massa foliar ao longo de 15 dias de experiência em microcosmos com folhas de carvalho (Quercus robur) inoculadas com o fungo A. Tetracladia na presença de concentrações crescentes de N-NO<sub>3</sub>. Os símbolos representam as concentrações (mg/L) testadas (0,5;10;25;-;50 e 100)</i> .....	51
<i>Figura 19: Biomassa produzida (µg ergosterol/mg peso seco de folha) pelo fungo Articulospora tetracladia em microcosmos com folhada e diferentes concentrações de azoto (N-NO<sub>3</sub>) ao longo de 15 dias de experiência. Folhas de carvalho (A), folhas de plátano (B)</i> .....	53
<i>Figura 20: Resultados da variação (%) de N-NO<sub>3</sub> e P-PO<sub>4</sub> nas águas dos microcosmos com folhada inoculada com o fungo A. tetracladia para as concentrações testadas aos 10 e 15 dias respetivamente. A linha a tracejado (100%) significa a incorporação/remoção máxima de nutrientes das águas pelos microrganismos, abaixo desta existe remoção e acima desta existe libertação de nutrientes. Salientar ainda que aos 10 dias só foram analisadas duas amostras</i> .....	56



## Lista de tabelas

<i>Tabela 1: Métodos de avaliação do estado ecológico de rios mais usados em planos de monitorização padronizados nos países da União Europeia. [adaptado: (Hering et al., 2003)]</i> .....	7
<i>Tabela 2: Índice de Qualidade do Bosque Ribeirinho (Munné, Solá, &amp; Prat, 1998)...</i>	16
<i>Tabela 3: Classes de qualidade da água definidas para o IBMWP (Alba-Tercedor, 1996)</i> .....	20
<i>Tabela 4: Classes de qualidade da água definidas para o IPtIN (Inag, 2009).....</i>	21
<i>Tabela 5: Parâmetros físico-químicos da água e qualidade do bosque ribeirinho nos três pontos de amostragem do rio Este em duas estações do ano (Inverno 2015 e Verão 2016). Média <math>\pm</math> desvio-padrão .....</i>	22
<i>Tabela 7: IBMWP (Iberian Biological Monitoring Working Party), IPtIN (Índice Português de Invertebrados dos rios do Norte) e EPT(Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera) no Inverno de 2015 e no Verão de 2016 nos três locais de amostragem no rio Este .....</i>	33





# **1. Avaliação da qualidade ecológica da água do rio Este (Braga-Portugal)**



## **1.1. Introdução**

A necessidade de realizar ações de biomonitorização e de desenvolver medidas de mitigação de problemas ecológicos nos rios da bacia do rio Ave, surge na sequência de problemas de poluição aquática que se têm arrastado ao longo dos anos.

A água é um bem essencial à vida e, como tal, deve ser mantida em boas condições. No entanto, devido ao desenvolvimento da indústria e práticas de má gestão, este recurso tem vindo a sofrer um declínio na sua qualidade. Estima-se que dois terços da população mundial venha a sofrer com a escassez de água até ao ano de 2025 (Shiklomanov, 1998; Saunders et al., 2002). Com o intuito de proteger, prevenir, e melhorar a qualidade do ambiente, de proteger a saúde humana e de promover a utilização racional dos recursos naturais foi criada a Diretiva Europeia do Quadro de Água (DQA; Directiva 2000/60/CE, 2000). Esta diretiva é o principal instrumento da Política da União Europeia relativo à água e estabelece um quadro de ação comunitária para a proteção de águas superficiais, de transição, costeiras e subterrâneas. Em Portugal, a Agência Portuguesa do Ambiente (APA) é a entidade responsável pela implementação desta diretiva.

Os rios desempenham duas funções importantes no meio físico que atravessam: naturais e socioeconómicas (Figura 1). Estes são coletores naturais das paisagens, e refletem o uso e a ocupação do solo e da sua bacia de drenagem. Os principais problemas resultantes das atividades humanas nas bacias de drenagem são o assoreamento e homogeneização do leito de rios, a diminuição da diversidade de habitats e micro-habitats e a eutrofização proveniente do aumento das concentrações de fósforo e azoto na água dos rios (Goulart & Callisto, 2003).

Geralmente, a monitorização envolve a comparação entre um local controlo (mais natural possível) com um local alterado (local de estudo), a fim de se verificar diferenças, caso existam, a nível ecológico. O restauro e a manutenção da integridade de um ecossistema deve ser multifuncional e multimétrico, ou seja, deve contemplar aspetos químicos, físicos e biológicos, uma vez que o rio é essencialmente um ecossistema dinâmico (Brookes & Shields, 1996).

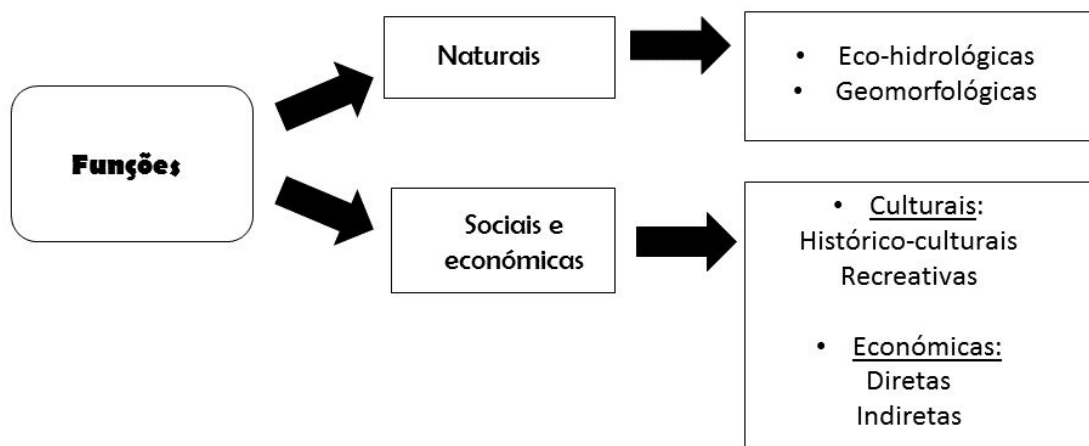


Figura 1: Funções desempenhadas pelos rios no meio-físico em que se inserem. [adaptado: Francisco & Silva, 2007]

### 1.1.1. Indicadores da integridade ecológica

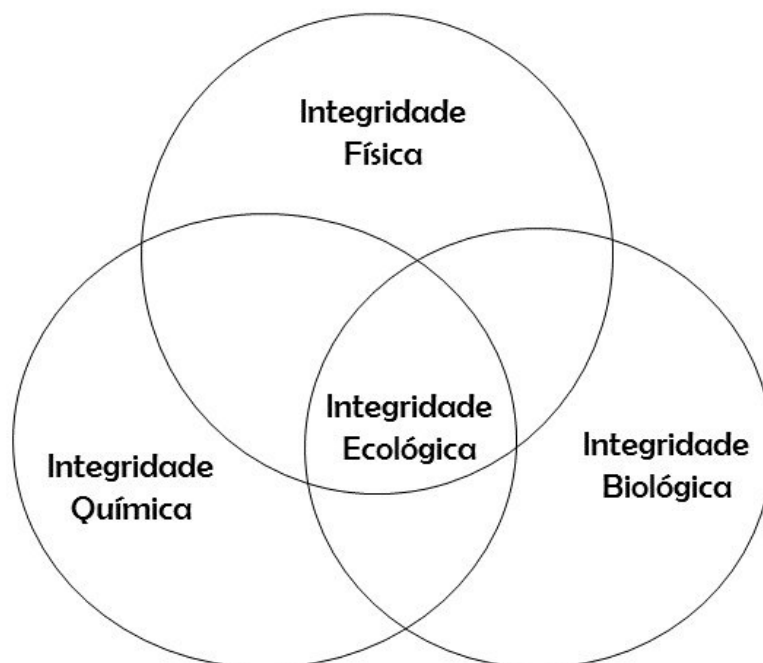
Integridade Ecológica pode ser definida como a capacidade de um ecossistema suportar e manter os processos chave e comunidades de organismos adaptados, tendo uma diversidade em espécies e organização funcional comparável com habitats naturais da mesma região (Schofield e Davies 1996). Campbell (2000) concluiu que integridade ecológica é uma propriedade do ecossistema quando este apresenta uma estrutura completa e todos os processos dentro dele funcionam perfeitamente. Segundo Barbour e seus colaboradores (2000) a integridade ecológica resulta da articulação de três elementos fundamentais: integridade física, química e biológica (Figura 2).

A integridade ecológica de um ecossistema resulta equitativamente de componentes estruturais e funcionais: a integridade estrutural relaciona-se com a composição quantitativa e qualitativa das comunidades e dos seus recursos e, por sua vez, a integridade funcional refere-se às taxas, padrões e importância relativa dos processos ao nível do ecossistema (Gessner & Chauvet, 2002).

Atualmente, é quase impossível encontrar um curso de água completamente inalterado pelas atividades humanas. O termo “minimamente” perturbado torna-se mais

apropriado para descrever as condições de um local que exiba integridade biológica elevada (Oliveira e Cortes, 2006).

A monitorização das variáveis físicas e químicas traz algumas vantagens na avaliação do estado ecológico dos ecossistemas aquáticos, tais como a identificação imediata de modificações nas propriedades físicas e químicas da água; a deteção precisa da variável modificada (Goulart & Callisto, 2003). No entanto, as comunidades biológicas refletem a integridade ecológica dos ecossistemas (integridade física, química e biológica), integrando os efeitos dos diferentes agentes de stress e fornecendo uma medida agregada dos impactos (Barbour *et al.*, 1999).



*Figura 2: Integridade Ecológica e seus elementos: Integridade Física, Química e Biológica.  
[adaptado de (Michael T Barbour et al., 2000)]*

### **1.1.2. Macroinvertebrados bentônicos como indicadores ecológicos**

Os macroinvertebrados bentônicos aquáticos são organismos de grande importância nos sistemas fluviais devido ao seu papel fundamental nas cadeias alimentares, como a ligação entre o processamento da matéria orgânica vegetal e a íctiofauna (Hauer & Resh, 1996). Por norma, habitam a zona bêntica dos sistemas aquáticos durante grande parte do seu ciclo de vida e compreendem uma diversidade de espécies pertencentes a diferentes grupos taxonômicos como os anelídeos, moluscos, crustáceos e principalmente insetos (Fonseca, 2011). São organismos muito usados como bioindicadores da qualidade ecológica de rios devido às características que possuem, tais como a duração do ciclo de vida e do ciclo reprodutivo, a fisiologia, o comportamento alimentar, a capacidade de dispersão e reprodutiva (Statzner et al., 2008; Feio & Dolédec, 2012). A fisiologia e a história de vida em conjunto indicam o desempenho destes organismos, e, quando alteradas, podem afetar a dinâmica das populações, por induzir mudanças na composição em espécies, na abundância e, deste modo, afetar as propriedades do ecossistema em que se inserem (Violle et al., 2007).

Os principais parâmetros a ter em conta na biomonitorização dos cursos de água englobam a avaliação da riqueza em espécies e a determinação dos índices de diversidade, a abundância de organismos tolerantes, a perda de espécies sensíveis, as medidas de produtividade primária e secundária, e a sensibilidade dos organismos a concentrações de substâncias potencialmente tóxicas através do uso de ensaios ecotoxicológicos (Barbour et al., 1999).

A utilização de parâmetros multimétricos é atualmente comum na avaliação da integridade ecológica dos sistemas aquáticos. Esta abordagem está centrada na obtenção de diferente informação de uma comunidade biológica que posteriormente dará origem a uma classificação geral relativamente ao grau de degradação e desvio relativamente aos estados de referência (Carina & Portela, 2014). Os índices normalmente usados são o BEAST - Benthic Assessment of Sediment T (Reynoldson et al. 1995), o AusRivas - Australian River Assessment Scheme (Simpson et al, 2000) e o RIVPACS - River Invertebrate Prediction And Classification System (Clarke et al 2003), tendo atualmente grande aplicação o software, ASTERICS, através de AQEM - programa de Avaliação Integrada da Qualidade Ecológica de rios e ribeiros na Europa usando

macroinvertebrados bentônicos Este último, em termos gerais, sugere uma forma de avaliar os impactos de várias perturbações (degradação morfológica ou poluição) (Hering et al., 2003) . No entanto, existe uma panóplia de métodos de avaliação da qualidade ecológica dos ecossistemas de rio usados nos países da União Europeia como se apresenta na (Tabela 1).

*Tabela 1: Métodos de avaliação do estado ecológico de rios mais usados em planos de monitorização padronizados nos países da União Europeia. [adaptado: (Hering et al., 2003)]*

<b>Método de avaliação</b>	<b>País</b>	<b>Referencia</b>
<b>Índice de Acidificação</b>	S	Henrikson and Medin, 1986, Johnson, 1998
<b>AMOEBa</b>	NL	Brink <i>et al.</i> ,1991
<b>Pontuação média por taxa (BMWP-ASPT)</b>	UK,IR,S	Armitage <i>et al.</i> ,1983,Chester,1980; Wright <i>et al.</i> ,1984
<b>Índice Biótico Belga (BBI)</b>	B,P,E L,GR	De Pauw and Vanhooren,1983; De Pauw <i>et al.</i> ,1992
<b>BMWP</b>	UK,S	Armitage <i>et al.</i> , 1983, Chester,1980; Wright <i>et al.</i> , 1984
<b>Pontuação biótica de Chandlers e Pontuação biótica média de Chandler</b>	UK	Chandler,1970, Balloch <i>et al.</i> , 1976
<b>Padrão Técnico Checo para a Avaliação da Qualidade da Água</b>	CZ	Sládecek,1973, Sládecknová <i>et al.</i> ,1998
<b>Índice Dinamarquês da Fauna ribeirinha (DSFI)</b>	DK,S	Skriver et al.,in press
<b>EKO</b>	NL	Verdonschot,1990
<b>EBEOSWA</b>	NL	Stowa,1992,Peeters <i>et al.</i> ,1994
<b>Índice biológico global - França (IBG)</b>	L,B	Verneaux <i>et al.</i> ,1982
<b>Índice biológico global normalizado (IBGN)</b>	F,B	Association Francaise de Normalisation, 1985
<b>Índice biótico Esteso (IBE)</b>	I	Ghetti,1997
<b>Índice k (Índice de qualidade)</b>	NL	Gardener and Tolkamp,1976
<b>Pontuação BMWP modificada (BMWP-ASPT)</b>	E	Alba-Tercedor and Sanchez-Ortega,1988
<b>Onorm M 6232</b>	A	Osterr, Normungsinstitut,1997
<b>Sistema de classificação de qualidade</b>	IR	De Pauw and Vanhooren,1983; De Pauw <i>et al.</i> ,1992
<b>Sistema de previsão e classificação de invertebrados de rio (RIVPACS)</b>	UK,IR	Armitage <i>et al.</i> ,1983,Wright <i>et al.</i> ,1993
<b>Índice Oligochaeta-Chironomidae de rio (Índice ROCI)</b>	FI	Paasavirta,1990
<b>Qualidade da água Saprobic</b>	A	Moog,1995,Moog <i>et al.</i> ,1999
<b>Saprobienindex DIN 38410</b>	D	DEV,1992

## **Objetivos**

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a qualidade ecológica da água de um troço urbanizado de um rio, o rio Este, localizado na bacia hidrográfica do rio Ave. Para tal, foram escolhidos 3 pontos de amostragem representativos do percurso do rio na cidade de Braga. A avaliação foi feita em duas estações do ano (Inverno e Verão) e baseou-se em parâmetros físico-químicos assim como em parâmetros biológicos. Deste modo, pretendemos avaliar o estado ecológico do rio Este na zona de Braga.

É importante avaliar o estado ecológico deste rio, uma vez que, sendo o único rio que atravessa a cidade é do interesse de todos os cidadãos saberem o impacto que exercem no rio. Este rio ao longo dos anos sofreu várias pressões a nível ecológico devido a descargas ilegais de resíduos urbanos e industriais, e que ainda se verificam pontualmente nos dias de hoje, bem como o desvio e a canalização do leito em determinados troços. A avaliação do estado ecológico da água em duas estações do ano permitirá analisar a dinâmica sazonal e confirmar se as conclusões se mantêm no tempo húmido e seco.



## **1.2. Material e Métodos**

### **1.2.1. Área de estudo**

O estudo aqui apresentado realizou-se no rio Este junto à cidade de Braga (Portugal). O rio Este é o principal afluente da margem direita do rio Ave e a sua nascente localiza-se na Serra do Carvalho, na faixa Este do concelho de Braga, a 465 metros de altitude, na freguesia de São Mamede de Este.

O rio Este insere-se na bacia hidrográfica do rio Ave (Figura 3), localizada no noroeste de Portugal entre os 41° 15' e 41° 40' de latitude Norte e 8° 00' e 8° 45' de longitude Oeste e cobre uma área de aproximadamente 1391 km<sup>2</sup>. A bacia hidrográfica do rio Ave devido às suas características geológicas, com um substrato rochoso composto essencialmente por quartzitos, granitos e xistos, é caracterizada por rios de água pouco mineralizada. Os seus rios são na sua maioria de pequena a média dimensão, com uma área de drenagem <100km<sup>2</sup>. O rio Este com cerca de 45 km, inicia-se num pequeno vale de características agrícolas e atravessa todo o concelho, desaguando em Touguinha, a cerca de 4 km de Vila do Conde. No seu percurso, ao longo do concelho de Braga, este rio apresenta um perfil sinuoso, podendo-se identificar dois tipos de troços principais: um que atravessa toda a cidade de Braga em canal de betão, e outro em leito normal, a partir do complexo industrial da Delphi. A bacia hidrográfica do rio Este tem 246 km<sup>2</sup>, dos quais 82 km<sup>2</sup> pertencem ao concelho de Braga, sendo os principais afluentes, a ribeira de Tenões, o ribeiro de Dadim, o rio da Veiga, a ribeira de São Martinho e a ribeira da Pinguela.

O concelho de Braga, localiza-se na região Noroeste de Portugal continental e é capital de distrito, pertencendo à NUT II (Norte) e à NUT III (Cávado). O concelho é constituído por 62 freguesias, perfazendo uma área total de 184 km<sup>2</sup>, inserindo-se numa região densamente povoada. O território está profundamente marcado pelos vales principais, dos rios Cávado e Este, que com uma orientação nordeste-sudoeste se abrem em direção ao litoral permitindo a circulação de massas de ar do atlântico carregadas de humidade. O rio Este dá origem a um vale inicialmente apertado mas que rapidamente se alarga formando a área em que se instalou a cidade de Braga desde os primórdios. Esta, ocupando uma posição central no concelho, foi inicialmente edificada numa colina localizada na separação dos dois vales principais. Ao longo do século, com o

desenvolvimento urbano, foi ocupando progressivamente a zona de vale na qual corre o rio Este (Braga, 2008).

Do ponto de vista estrutural, a área em estudo, localiza-se no sector NW do chamado Maciço Hespérico (Maciço Ibérico), também designado por Soco Hercínico, que constitui a parte central e ocidental dos terrenos que compõem a Península Ibérica. Do ponto de vista geotectónico regional, esta região hidrográfica insere-se, em termos da zonação definida para o Maciço Ibérico por Lotze (1945) e redefinida posteriormente por Julivert et al.(1974), na Zona da Galiza Média-Trás-os-Montes e Zona Centro – Ibérica.

Nesta região, a precipitação é mais frequente e abundante nos meses de outubro a março, onde os valores médios estão acima dos 156 mm. De abril até setembro verificam-se os meses mais secos (valores médios de precipitação menores que 133 mm). Os meses de julho e agosto são os meses de seca mais severa, com precipitação bastante reduzida (26 e 30 mm, respetivamente) (ARH Tejo, 2012). A temperatura média anual ronda os 13,7°C. Nos meses mais frios (dezembro e janeiro) a temperatura do ar é de aproximadamente 8-9°C. E nos meses mais quentes, julho e agosto os valores de temperatura situam-se entre 19,5-21°C (ARH Tejo, 2012).

Segundo o levantamento da ocupação de solo em 2001, constatou-se que os espaços urbanos existentes ocupam uma área de 57,13 km<sup>2</sup>, correspondendo a 31% do total do concelho. No que toca a espaços de indústria e/ou armazéns, estes perfazem cerca de 2,59 km<sup>2</sup>, constituindo cerca de 1,4% da área total do concelho.

Os espaços florestais representavam 61,16 Km<sup>2</sup>, e apresentam-se repartidos em: espaços florestais de produção, de proteção, e de usos múltiplos, com 15,4%, 1,2% e 16,7% da área total do concelho, respetivamente. Cerca de 25% do concelho era constituído por espaços agrícolas (45,88 km<sup>2</sup>) (Braga, 2008).

Quanto à floresta ripícola, é possível encontrar numa estreita faixa junto às linhas de água com restos da antiga floresta caducifólia, onde, para além do carvalho (*Quercus robur*), é possível encontrar o amieiro (*Alnus glutinosa*) e o salgueiro (*Salix atrocinera*) (Gomes et al., 2001).



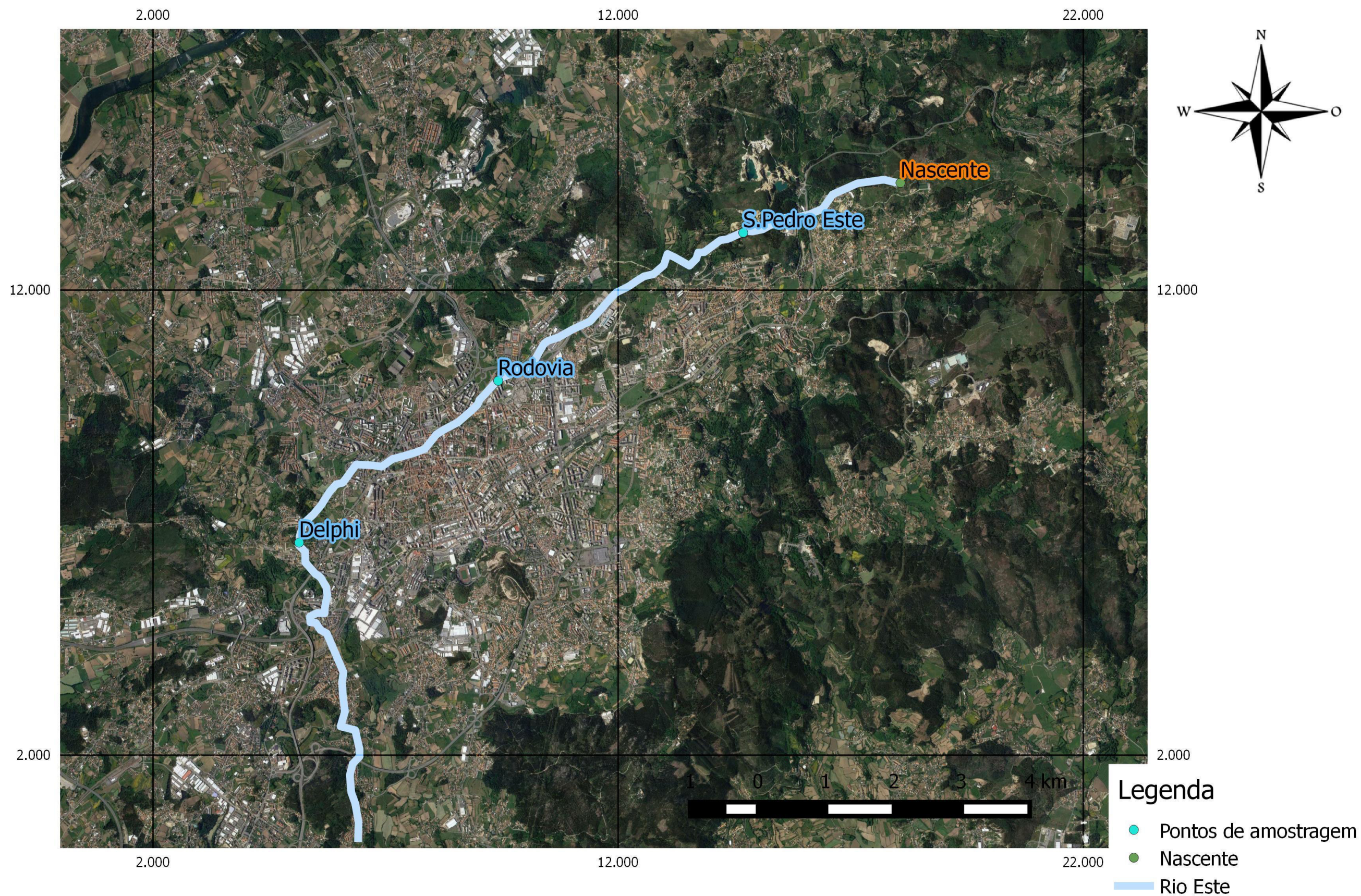
### 1.2.2. Procedimento de amostragem

Foram escolhidos três pontos para amostragem biológica e caracterização química das águas do rio Este. Os pontos escolhidos situam-se i) nas proximidades da nascente, antes da entrada do rio na cidade (S. Pedro de Este - coordenadas 41,572361 -8,359893), ii) na zona dos campos da Rodovia, aproximadamente a meio do percurso percorrido pelo rio na cidade de Braga (Rodovia – coordenadas 41,552818 -8,403114), e o iii) na zona da Delphi e outros compartimentos fabris, já nos limites da cidade de Braga (Delphi – coordenadas 41,53146 -8,438214) (Figura 4).

- **S. Pedro de Este:** localizado cerca de 3 km a jusante da nascente em S. Pedro de Este e de fácil acesso. O local apresenta essencialmente campos agrícolas do lado direito e possui ao longo do seu percurso grande quantidade de macrófitas aquáticas, como por exemplo *Ranunculus penicillatus*. Do lado esquerdo do canal não existe qualquer tipo de vegetação ribeirinha devido à existência de um muro a todo comprimento do rio. O canal é essencialmente constituído por areia e cascalho. O rio antes de chegar a este local atravessa essencialmente uma zona de montanha o que seria de esperar um estado ecológico menos degradado em relação aos restantes locais (Figura 5-A).
- **Rodovia:** insere-se no complexo desportivo da Rodovia a cerca de 10 km da nascente. Este local destaca-se pelo canal estar fortemente modificado devido à presença de uma zona de lazer. O local de amostragem é caracterizado pela presença de algumas macrófitas, briófitas e ainda pequenos bancos de areia e limo ao longo do canal. A área envolvente caracteriza-se por herbáceas e alguma floresta ripícola (*Betula* sp., *Salix* sp.), sendo o leito completamente desprovido de vegetação. A montante deste local, o rio sofreu recentemente modificações estruturais de forma a recuperar habitats que tinham sido perdidos pela canalização do rio na cidade (Figura 5-B).

- **Delphi:** localiza-se a jusante de uma zona industrial, a cerca de 14 km da nascente. Visualmente é possível constatar um elevado grau de degradação do canal e de poluição do mesmo (deposição no leito de restos de vestuário, plásticos, artefactos de metal e borracha, etc). Os sedimentos predominantes neste local são cascalho, areia e limo. A área envolvente do troço é constituída essencialmente por espécies herbáceas e espécies arbóreas ripícolas como *Alnus glutinosa*, *Salix* sp., e *Betula* sp.. Junto ao leito não se verifica qualquer tipo de floresta ribeirinha sendo um leito totalmente aberto sem ensombramento (Figura 5-C).





Sistema de coordenadas em WGS84

Figura 4: Localização dos pontos de amostragem no rio Este (Mapa feito em QGIS – Sistema de Georreferenciamento)





*Figura 5: Locais de amostragem: A -S. Pedro de Este, B- Rodovia, C- Delphi*

*Imagens da esquerda- Inverno 2015; direita- Verão 2016*

### 1.2.3. Parâmetros físico-químicos da água

Em cada local de amostragem, foi efetuada a análise dos parâmetros físicos e químicos da água, nomeadamente da temperatura (°C), do oxigénio dissolvido (OD- mg O<sub>2</sub>/L), do pH (escala de Sorensen), do total de sólidos dissolvidos (TDS) (mg/L) e da condutividade elétrica (μS/cm) com uma sonda multiparamétrica (Multiline F/Set-3 no. 400327 WTW).

Adicionalmente, foram recolhidas amostras de água em garrafas de plástico e, no laboratório, foram determinadas as concentrações de amónia N-NH<sub>4</sub> (HACH Kit, programa 385) de fósforo P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (HACH Kit, programa 490) e de nitratos N-NO<sub>3</sub>- (HACH Kit, programa 351).

Estas medições foram efetuadas 3 vezes no Inverno de 2015 (16/12,13/01,20/01) e 3 vezes no Verão de 2016 (12/09,06/10,19/10).

### 1.2.4. Caracterização da vegetação ribeirinha

Foi ainda efetuada uma análise do estado do ecossistema ribeirinho de forma a determinar o Índice QBR (Qualidade do Bosque Ribeirinho). Para este índice é atribuída uma pontuação de 0 (mínimo) a 25 (máximo) para 4 alíneas apresentadas sobre o estado do bosque ribeirinho. No final a soma não poderá ultrapassar os 100 pontos. Uma cor associada à qualidade do local será atribuída como indicado na Tabela 2

*Tabela 2: Índice de Qualidade do Bosque Ribeirinho (Munné, Solá, & Prat, 1998)*

Nível de Qualidade	QBR	Cor
Bosque ribeirinho sem alterações, qualidade muito boa, estado natural	≥95	Azul
Bosque ligeiramente perturbado, qualidade boa	75-90	Verde
Início de alterações importantes, qualidade intermédia	55-70	Amarelo
Alteração forte, má qualidade	30-50	Laranja
Degradação extrema, qualidade péssima	≤25	Vermelho



### 1.2.5. Macroinvertebrados bentónicos

A amostragem de macroinvertebrados bentónicos foi efetuada no Inverno de 2015 (16/12) e no Verão de 2016 (12/09) de acordo com o manual “Avaliação Biológica da Qualidade da Água em Sistemas Fluviais segundo a Diretiva Quadro da Água: Protocolo de amostragem e análise para os invertebrados bentónicos” (INAG, 2008). O processo iniciou-se com a seleção de troços de 50 metros, representativos dos habitats presentes. Procurou-se que a amostragem dos habitats fosse realizada de acordo com a sua representatividade em função dos tipos identificados (e.g. substratos inorgânicos e orgânicos). As comunidades foram amostradas com recurso a uma rede de mão com uma largura de 0,25 m. Em cada local efetuaram-se cerca de 6 arrastos de 1 m de comprimento com a rede de mão, distribuídos de forma proporcional pelos habitats existentes. Os arrastos foram efetuados de jusante para montante, tendo o cuidado de colocar a abertura da rede contra o sentido da corrente. O sedimento foi removido com os pés, de forma a conduzir os organismos desalojados para o interior da rede, arrastados pela corrente. Em algumas situações de presença de macrófitas procedeu-se ainda ao varrimento vertical (Figura 6).



*Figura 6: Recolha de macroinvertebrados com rede de mão*

Após a recolha, o conteúdo da rede foi acondicionado em sacos de plástico, os quais foram fechados e preservados no frio enquanto transportados até ao laboratório. No laboratório, o material foi lavado sobre um crivo de malha calibrada com 500  $\mu$ m de diâmetro. O conteúdo do crivo foi colocado em tabuleiros plásticos com uma pequena porção de água. A amostra foi sujeita a uma análise minuciosa de forma a se separarem todos os macroinvertebrados bentónicos, os quais foram colocados, com o auxílio de uma pinça, em frascos contendo álcool a 70%. Estes foram devidamente fechados e etiquetados com a identificação da amostra (data, nome do local, curso de água, nome do responsável pela triagem e respetivos taxa). A identificação dos indivíduos efetuou-se na grande maioria até ao nível taxonómico da Família. A identificação realizou-se mediante o uso de uma lupa binocular e o auxílio de chaves dicotómicas apropriadas (Tachet et al., 1987) (Figura 7).



*Figura 7: Exemplos de macroinvertebrados amostrados nos três pontos de recolha*

### 1.2.6. Tratamento de dados

Para determinar o estado ecológico da água com base nas comunidades macrobentónicas, utilizámos várias medidas de biodiversidade e índices bióticos, nomeadamente:

- **Riqueza em unidades sistemáticas (S)**
- **Número total de indivíduos (N);**
- **Índice de Shannon (H')**: caracteriza a diversidade de taxa numa comunidade tendo em conta abundância e a distribuição dos indivíduos.

$$H' = \sum p_i \ln p_i$$

em que:

$p_i$  –  $n_i/N$

$n_i$  - número de indivíduos do grupo taxonómico  $i$

$N$  - número total de indivíduos

- **Índice de equitabilidade de Pielou (J')**: tem em conta a distribuição dos organismos pelas diferentes famílias existentes na comunidade.

$J' = H'/\ln S$  em que:  $H'$  - diversidade de Shannon-Wiener

$S$  - número de taxa presentes

$\ln$  - logaritmo natural ou neperiano

- **%EPT (Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera)**: cálculo da percentagem dos organismos presentes pertencentes a estas ordens em relação à amostra total.

$$EPT = \frac{\text{nº indivíduos (Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera)}}{\text{total de indivíduos}} \times 100$$

- **IBMWP (Iberian Biological Monitoring Working Party)**: baseia-se na identificação dos organismos até ao nível taxonómico da família. Para cada família é atribuída uma pontuação, presente numa escala, que varia entre 10 e 1, segundo um gradiente orientado da menor (maior pontuação) para uma maior (menor pontuação) tolerância à poluição. O somatório de todas as pontuações relativas às famílias presentes em cada amostra,

permite enquadrar os valores obtidos nas cinco classes de qualidade (Tabela 3) e, assim, obter uma classificação da qualidade biológica dos locais amostrados.

Tabela 3: Classes de qualidade da água definidas para o IBMWP (Alba-Tercedor, 1996)

IBMWP (pontuação)	Classe	Significado (em termos de qualidade da água)
< 15	V	Água fortemente contaminada
16 - 35	IV	Água muito contaminada
36 - 60	III	Água moderadamente contaminada
61 - 100	II	Água ligeiramente contaminada
> 100	I	Água limpa ou não contaminada

- **Índice Português de Invertebrados do Norte- IPTIN** (Inag, 2009) : desenvolvido e aplicado de acordo com a Diretiva Quadro da Água, e que integra diferentes métricas:

$$IPTIN = N^{\circ} \text{ taxa} * 0,25 + EPT * 0,15 + Eveness * 0,1 + (IASPT - 2) * 0,3 + \text{Log}(\text{Sel ETD} + 1) * 0,2$$

sendo:

- **EPT**: N° de famílias pertencentes aos Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera;
- **Evenness**: Designado por índice de Pielou ou Equitabilidade;
- **IASPT**: ASPT Ibérico, que corresponde ao IBMWP (Alba-Tercedor 2000) dividido pelo número de famílias presentes;
- **Log<sub>10</sub> (Sel. ETD+1)** - Log<sub>10</sub> de (1 + soma das abundâncias de indivíduos pertencentes às famílias Heptageniidae, Ephemeridae, Brachycentridae, Goeridae, Odontoceridae, Limnephilidae, Polycentropodidae, Athericidae, Dixidae, Dolichopodidae, Empididae, Stratiomyidae).

No cálculo deste índice são realizados dois passos de normalização, um antes da multiplicação das métricas pelos fatores de ponderação, e outro após o somatório das métricas ponderadas para que o valor final venha expresso em Rácios de Qualidade Ecológica (EQR) (Tabela 4). O primeiro passo de normalização foi realizado através do quociente entre o valor observado e o valor de referência, que variaram conforme o tipo de rio a que correspondia o ponto de amostragem. O segundo passo de normalização foi

realizado através do quociente entre o valor esperado e o de referência, que neste caso se refere aos diferentes tipos de rios e aos valores de fronteira entre as classes de qualidade em EQR (Anexos).

*Tabela 4: Classes de qualidade da água definidas para o IPtIN (Inag, 2009)*

<b>CLASSE</b>	<b>IP<sub>tIN/S</sub> Qualidade da Água</b>
<b>I</b>	<b>Excelente</b>
<b>II</b>	<b>Bom</b>
<b>III</b>	<b>Razoável</b>
<b>IV</b>	<b>Medíocre</b>
<b>V</b>	<b>Mau</b>

Os valores das variáveis abióticas entre locais e entre estações do ano foram comparados através de uma two-way ANOVA. Para estas análises recorreu-se ao programa Prism 5.0 para Windows (Prism, 2011).

A ordenação dos locais em relação às variáveis da água do rio foi feita através da análise de componentes principais (PCA), recorrendo ao programa R Studio 1.0.136 (RStudio Inc., 2015).

### 1.3. Resultados e Discussão

#### 1.3.1. Parâmetros físico-químicos e qualidade do bosque ribeirinho

A monitorização das variáveis físicas e químicas traz algumas vantagens na avaliação do estado ecológico dos ecossistemas aquáticos, tais como a identificação imediata de modificações nas propriedades físicas e químicas da água (Goulart & Callisto, 2003).

Na Tabela 5 são apresentados os parâmetros físico-químicos medidos no campo, as análises químicas efetuadas em cada um dos locais de amostragem no Inverno de 2015 e no Verão de 2016 e a qualidade do bosque ribeirinho (QBR).

*Tabela 5: Parâmetros físico-químicos da água e qualidade do bosque ribeirinho nos três pontos de amostragem do rio Este em duas estações do ano (Inverno 2015 e Verão 2016). Média  $\pm$  desvio-padrão*

Rio Este (Braga)	Inverno (média $\pm$ DP)			Verão (média $\pm$ DP)			VMA (valores máximos admissíveis)
Parâmetros Físico- Químicos	S. Pedro de Este	Rodovia	Delphi	S. Pedro de Este	Rodovia	Delphi	
Temperatura (°C)	13,4 $\pm$ 0,5	13,8 $\pm$ 0,1	14,3 $\pm$ 0,1	17,4 $\pm$ 0,3	19,1 $\pm$ 0,6	19,5 $\pm$ 0,3	
Condutividade ( $\mu$ S/cm)	67,3 $\pm$ 6,9	117,0 $\pm$ 7,4	147,7 $\pm$ 18,0	89,7 $\pm$ 2,9	149,3 $\pm$ 4,9	209,0 $\pm$ 30,	
Oxigénio dissolvido (mg/l)	10,2 $\pm$ 7,3	10,1 $\pm$ 7,2	9,4 $\pm$ 6,7	8,5 $\pm$ 2,2	13,2 $\pm$ 3,7	10,0 $\pm$ 1,8	
pH	6,5 $\pm$ 0,2	7,0 $\pm$ 0,2	6,9 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 0,3	7,5 $\pm$ 0,5	7,2 $\pm$ 0,4	6-9
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	0,02 $\pm$ 0,0	0,14 $\pm$ 0,0	0,77 $\pm$ 0,3	<0,01 $\pm$ 0,0	0,15 $\pm$ 0,1	0,40 $\pm$ 0,1	$\leq$ 1
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	7,3 $\pm$ 1,7	12,0 $\pm$ 0,6	14,4 $\pm$ 1,0	10,7 $\pm$ 1,1	11,7 $\pm$ 0,9	15,4 $\pm$ 0,2	$\leq$ 25
P-PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	0,02 $\pm$ 0,0	0,04 $\pm$ 0,0	0,07 $\pm$ 0,0	0,02 $\pm$ 0,0	0,05 $\pm$ 0,0	0,08 $\pm$ 0,0	$\leq$ 0,10
Largura (m)	2	1,5	4	2	1,5	4	



Profundidade (cm)	15	10	25	15	10	25	
<b>Índice QBR</b> (Qualidade do Bosque Ribeirinho)	Mau estado	Mau estado	Mau estado	Mau estado	Mau estado	Mau estado	

É possível verificar que, durante o Inverno, a temperatura média da água dos três locais amostrados situava-se próximo dos 14°C, e que no Verão esta aumentou para os 19°C aproximadamente. A nível de pH não se verificaram grandes alterações entre estações do ano (Inverno e Verão) situando-se os valores deste parâmetro entre 7 e 8, pH a tender para o alcalino, o que não era esperado tendo em conta que estamos numa região de rochas siliciosas. O valor de pH não foi significativamente afectado pelo local de amostragem nem pela estação do ano (two-way ANOVA,  $p>0,05$ ).

No que respeita à condutividade, parâmetro cujos valores aumentam com o aumento dos iões presentes na água, verificou-se uma subida de valores do Inverno para o Verão. No Inverno tivemos valores médios de 67  $\mu\text{S/cm}$  para o local mais a montante (S. Pedro de Este), aumentando para 117  $\mu\text{S/cm}$  na Rodovia e para 147  $\mu\text{S/cm}$  junto à Delphi. No Verão os valores também aumentaram de montante para jusante mas subiram para 89  $\mu\text{S/cm}$ , 149  $\mu\text{S/cm}$  e 209  $\mu\text{S/cm}$  respetivamente para os mesmos locais. Os valores de condutividade não variaram significativamente com o local de amostragem nem com a estação do ano (two-way ANOVA,  $p>0,05$ ).

O oxigénio dissolvido na água variou entre os 9 mg/L (Delphi) e os 10 mg/L (S. Pedro de Este e Rodovia) no Inverno, e situou-se nos 8,5 mg/L no local a montante, nos 13,2 mg/L na Rodovia e nos 10 mg/L na Delphi no Verão. Os valores de  $\text{O}_2$  dissolvido não variaram significativamente com o local nem com a estação do ano (two-way ANOVA,  $p>0,05$ ).

No que respeita ao parâmetro  $\text{N-NH}_4^+$ , verificou-se um aumento ao longo do percurso do rio desde S. Pedro de Este (0,02 mg/L) até Delphi (0,07 mg/L) no Inverno. No Verão, os resultados demonstram mais uma vez um aumento de montante para jusante: S. Pedro de Este continha menor quantidade de  $\text{N-NH}_4$  (<0,01 mg/L), seguindo-se a Rodovia (0,15 mg/L) e a Delphi (0,40 mg/L). Verificou-se uma pequena oscilação entre Inverno e o Verão. Em geral, não se verificaram diferenças significativas entre os locais nem entre estações do ano (two-way ANOVA,  $p>0,05$ ).

Para o  $\text{N-NO}_3^-$  os resultados mostraram um aumento de 7,3 mg/L a montante para 12,0 mg/L a meio do percurso, atingindo os 14,4 mg/L a jusante no Inverno. O mesmo padrão foi encontrado no Verão com um aumento da concentração de nitratos de S. Pedro de Este (10,7 mg/L) até à Delphi (15,4 mg/L) mas com valores superiores aos encontrados no Inverno. Este parâmetro físico-químico variou significativamente com o local de amostragem nas duas estações do ano estudadas (two-way ANOVA,  $p < 0,05$ ).

O  $\text{P-PO}_4^-$  seguiu a tendência dos restantes parâmetros físico-químicos, traduzindo um aumento de montante (0,02 mg/L) para jusante (0,07 e 0,08 mg/L) tanto no Inverno como no Verão. Não se verificaram efeitos significativos entre locais nem entre estações do ano (two-way ANOVA,  $p > 0,05$ ).

Estudos efetuados em rios do norte, nomeadamente Oliveira, Agra e Andorinhas, que não atravessam uma cidade demonstram parâmetros físico-químicos mais baixos do que os do rio Este (Antunes, 2013; Duarte, 2014). Este facto vem corroborar a ideia de que a cidade provoca impactos na água do rio, nomeadamente no que respeita ao aumento da concentração de nutrientes.

De forma a perceber de que forma os locais de amostragem poderiam ser ordenados em função dos parâmetros abióticos, recorreu-se à análise multivariada de componentes principais (PCA). No Inverno 2015, a ordenação de componentes principais (PCA) para as variáveis físico-químicas da água do rio Este demonstrou que o eixo 1 explicava 98% de variância, enquanto que o eixo 2 apenas explicava 2%. Verificou-se que as variáveis indicativas de eutrofização da água do rio (condutividade,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{PO}_4$  e  $\text{NH}_4$ ) estavam positivamente correlacionadas com o PC1 (Figura 8). Isto permitiu-nos, ordenar os locais segundo um gradiente crescente de eutrofização: S. Pedro de Este < Delphi < Rodovia.



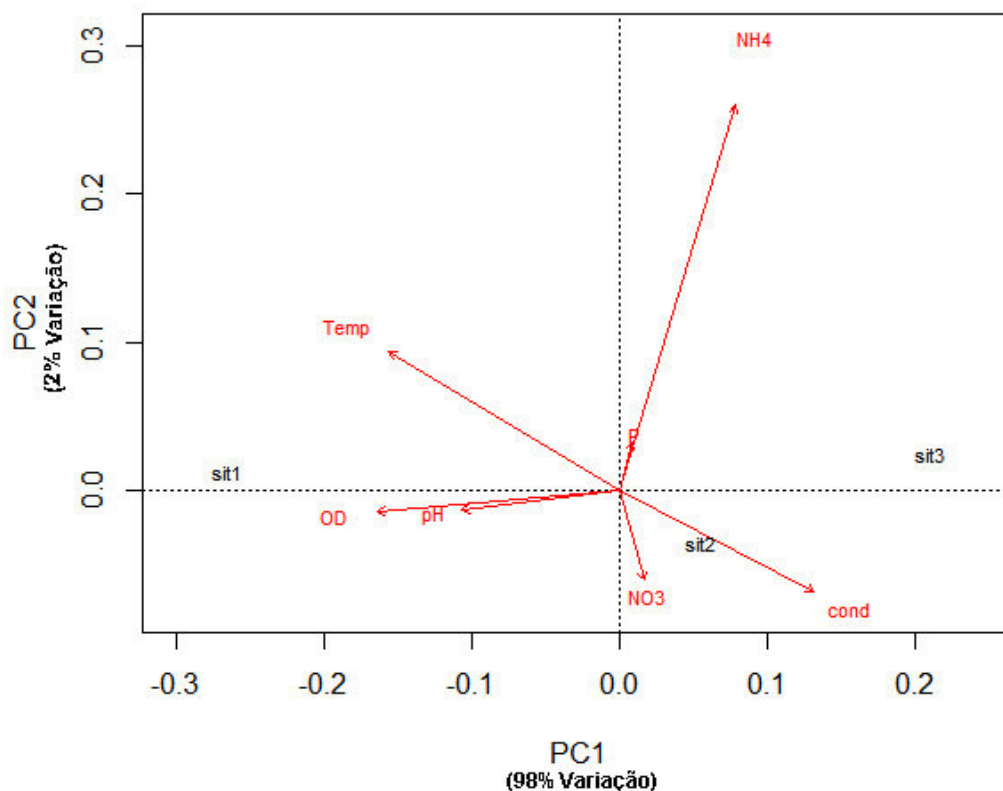


Figura 8: Análise de componentes principais (PCA) para os três locais em estudo no Inverno de 2015. Sit1- S. Pedro de Este; sit2- Rodovia; sit3- Delphi

No Verão 2016, a ordenação de componentes principais (PCA) para as variáveis físico-químicas da água do rio Este demonstrou que o eixo 1 explicava 91% de variância enquanto que o eixo 2 apenas explicava 9% (Figura 9). Mais uma vez, a PCA demonstrou que os fatores físico-químicos relacionados com a eutrofização da água do rio estavam positivamente correlacionados com o PC1. Deste modo, foi possível ordenar os locais segundo um gradiente de eutrofização crescente: S. Pedro de Este<Rodovia<Delphi.

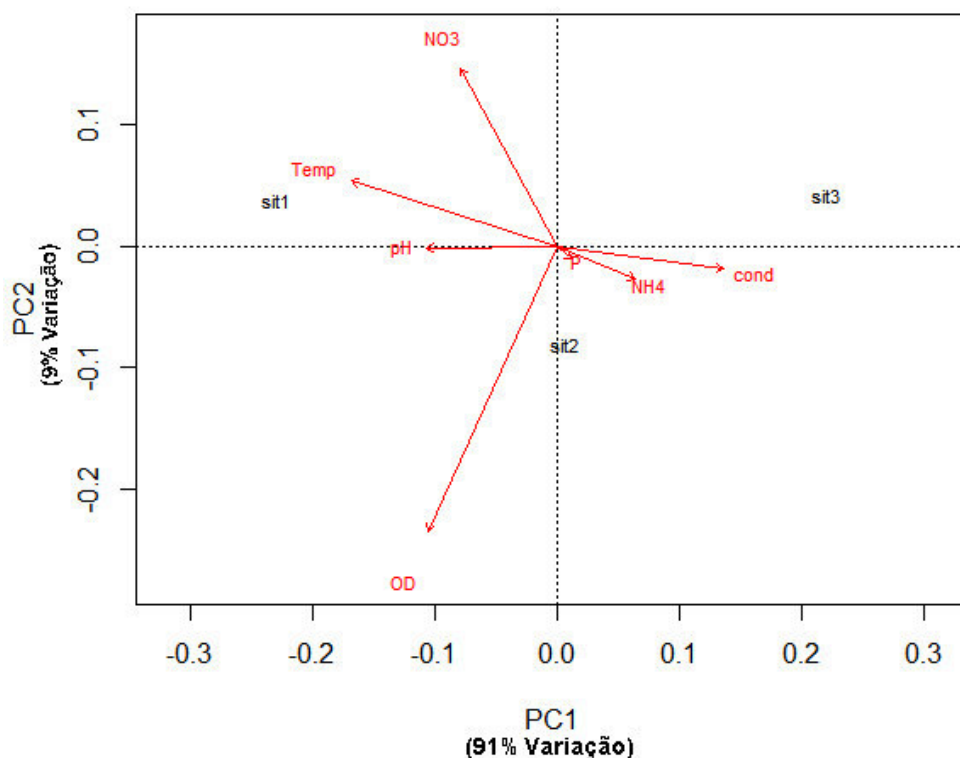


Figura 9: Análise de componentes principais (PCA) para os três locais de amostragem no Verão de 2016. sit1- S<sup>a</sup> Pedro de Este; sit2- Rodovia; sit3- Delphi

Os resultados das PCA efetuadas para as duas estações do ano vêm mais uma vez corroborar os resultados já então descritos. Verificou-se que os três locais de amostragem diferiam ao nível dos parâmetros físico-químicos. Este facto leva-nos a colocar a hipótese de que as comunidades macrobentónicas também possam ser diferentes entre os locais estudados.

Na generalidade, os parâmetros físico-químicos que mais indicam contaminação das águas (condutividade,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_3$  e  $\text{PO}_4$ ) aumentaram ao longo do troço do rio para os três locais amostrados. No local de S. Pedro de Este estes parâmetros tinham valores mais baixos, o que seria de esperar uma vez que este é um local situado a montante da cidade de Braga. Ainda assim, poderá ser afetado essencialmente pelas atividades agrícolas e pecuárias (Carpenter et al., 1998) evidentes naquele local. Nos locais da Rodovia e Delphi verificou-se um aumento de condutividade e, conseqüentemente, da concentração de nutrientes na água devido ao facto destes locais já se situarem dentro da cidade o que pode ter promovido contaminação devido à circulação de automóveis, alguma indústria

existente junto ao canal do rio e resíduos provocados pela grande densidade de habitantes (Smith & Smith, 2007).

Quanto ao Índice de Qualidade do Bosque Ribeirinho (QBR), verificou-se uma pontuação abaixo de 25 em todos os locais de amostragem, o que sugere um mau estado do bosque ribeirinho. Verificou-se que este é quase inexistente ao longo do percurso do rio devido à sua canalização. O bosque ribeirinho é essencial para assegurar as funções dos ecossistemas uma vez que fornece matéria orgânica, através de folhada que cai das árvores e entra nos rios, para alimentar os microrganismos e macroinvertebrados bentônicos detritívoros (Graça, 2001; Lecerf et al., 2005), ajuda na captação do excesso de nutrientes provenientes da lixiviação dos solos, estabiliza as margens e protege os organismos do aquecimento excessivo das águas (Naiman & Décamps, 1997; Swan, Healey, & Richardson, 2008).

### **1.3.2. Comunidades de macroinvertebrados bentônicos**

#### **1.3.2.1. Medidas de diversidade**

Neste estudo foram efetuadas duas campanhas de amostragem em duas estações do ano (Inverno e Verão). Os organismos foram identificados até ao nível taxonómico da família, sempre que possível.

Durante a campanha de inverno de 2015, foram identificados no total 684 indivíduos, distribuídos por 11 ordens e 26 famílias (Anexos). Os grupos faunísticos dominantes nesta época do ano foram: para o local S. Pedro de Este, a ordem Gastropoda com cerca de 29% dos indivíduos devido à presença da família Physidae, seguida da ordem Tricladia representada pela família Planaridae com 22% (Figura 10). O local da Rodovia era dominado pela ordem Oligochaeta com 40% de indivíduos pertencentes à família Lumbriculidae e 14% à família Lumbricidae. No local de amostragem mais a jusante (Delphi), a ordem Ephemeroptera representada pela família Baetidae (78%) foi o taxa dominante, seguido da ordem Díptera representada pela família Chironomidae (13%) Em geral, verificou-se que a riqueza taxonómica em macroinvertebrados nesta estação do ano diminuiu de montante para jusante. Os dados obtidos mostraram que

durante o Inverno de 2015, em S. Pedro de Este as ordens Gastropoda e Tricladia (51%) foram os taxa dominantes. Na Rodovia foram encontrados essencialmente indivíduos da ordem Oligochaeta (40%) e na Delphi da ordem Ephemeroptera (78%) (Figura 10). Esta representatividade elevada de Ephemeroptera na Delphi não seria de esperar uma vez que este é o local com maior concentração de nutrientes. O que pode explicar a abundância relativa desta ordem é o facto do número total de indivíduos ser diminuto. De um modo geral, pode-se concluir que durante o Inverno havia uma dominância de organismos tolerantes à contaminação (Callisto, Gonçalves, & Moreno, 2005; Moreno & Callisto, 2004).

No verão de 2016 foram identificados 759 indivíduos distribuídos por 15 ordens e 31 famílias (Anexo). Durante esta estação do ano verificou-se que, para o local S. Pedro de Este, o grupo faunístico Diptera predominava com 62% de indivíduos pertencentes à família Chironomidae (Figura 10). Estava ainda presente a ordem Odonata representado pela família Libellulidae com cerca de 8% dos indivíduos. No local da Rodovia, predominava mais uma vez o taxa Chironomidae com cerca de 67%, seguido pelo taxa Crenobia (Tricladia) com 24% .

Ao contrário do inverno, no verão, no local da Delphi predominou o grupo faunístico Oligochaeta com cerca de 56% de Lumbricidae, estando o taxa Chironomidae (18%) também bem representado (Figura 10). Nesta estação do ano, verificou-se que a riqueza e o numero de indivíduos total amostrados aumentou em relação ao inverno de 2015. Nos locais S. Pedro de Este e Rodovia havia uma predominância da ordem Diptera (62% e 67% respetivamente). Na Delphi, a ordem Oligochaeta (56%) foi a mais representada. Pode concluir-se que, mais uma vez, houve predominância de organismos pouco sensíveis à qualidade de água (Callisto et al., 2005; Moreno & Callisto, 2004).

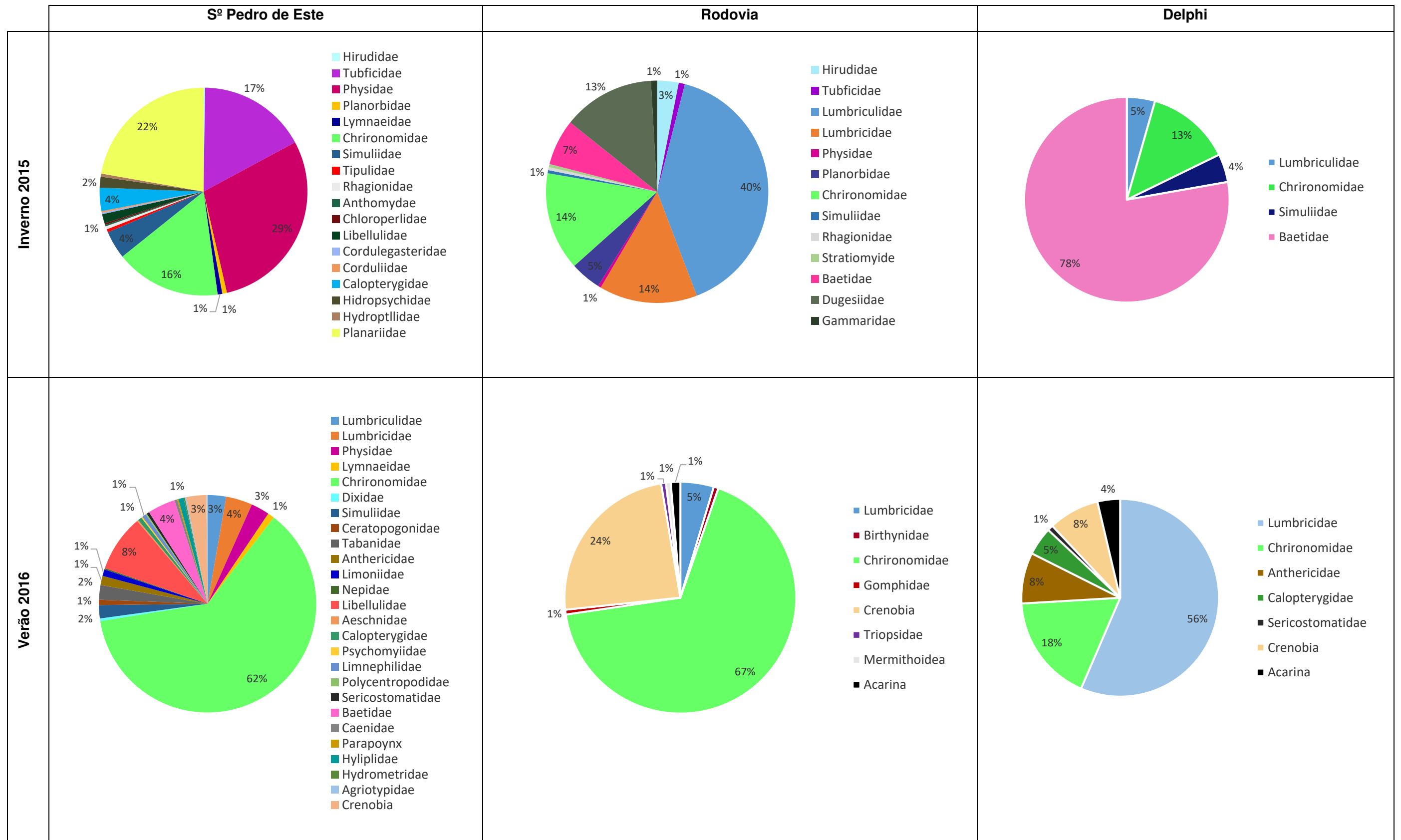


Figura 10: Percentagem de famílias recolhidas em cada ponto de amostragem para o período de tempo em estudo (Inverno 2015 e Verão 2016)

Na Figura 11 está representada a variação do índice de Shannon ( $H'$ ) das comunidades de macroinvertebrados do rio Este no Inverno de 2015 e no Verão de 2016. Pode verificar-se que existiu uma variação sazonal na riqueza em espécies entre o Inverno de 2015 e o Verão de 2016. Verifica-se que no Inverno de 2015 existiu uma diminuição na riqueza em espécies de montante (S. Pedro de Este) para jusante (Delphi). Esta diminuição foi menos acentuada no Verão de 2016, mas S. Pedro de Este continuou a ser o local que apresentou maior diversidade de Shannon e maior riqueza em espécies. Estes dados corroboram os resultados obtidos na medição de parâmetros físico-químicos os quais mostraram um aumento da contaminação da água, nomeadamente por eutrofização.

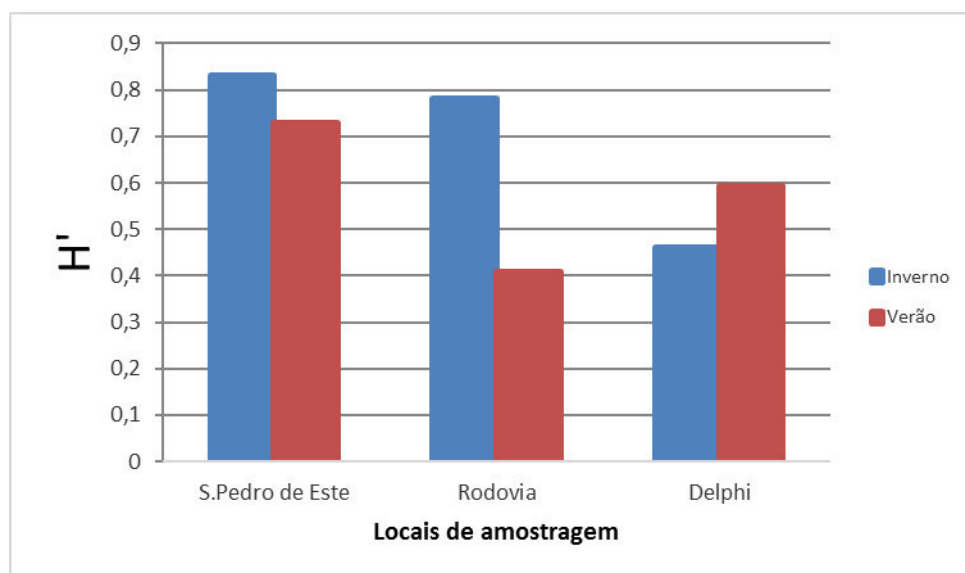


Figura 11: Variação do índice de Shannon ( $H'$ ) das comunidades de macroinvertebrados do rio Este no Inverno de 2015 e no Verão de 2016

Quanto ao índice de Pielou ( $J'$ ) este não variou muito no Inverno de 2015 ao longo do troço do rio (Figura 12). As diferenças no  $J'$  acentuaram-se no Verão de 2016, particularmente devido à dominância de determinados grupos faunísticos, nomeadamente Oligochaeta, no local Delphi. Estes resultados seriam de esperar visto que, a riqueza taxonómica vai diminuindo de montante para jusante o que indica a predominância de determinados grupos faunísticos nomeadamente tolerantes a alterações ambientais como é o caso da Delphi onde predominam o taxon Oligochaeta.

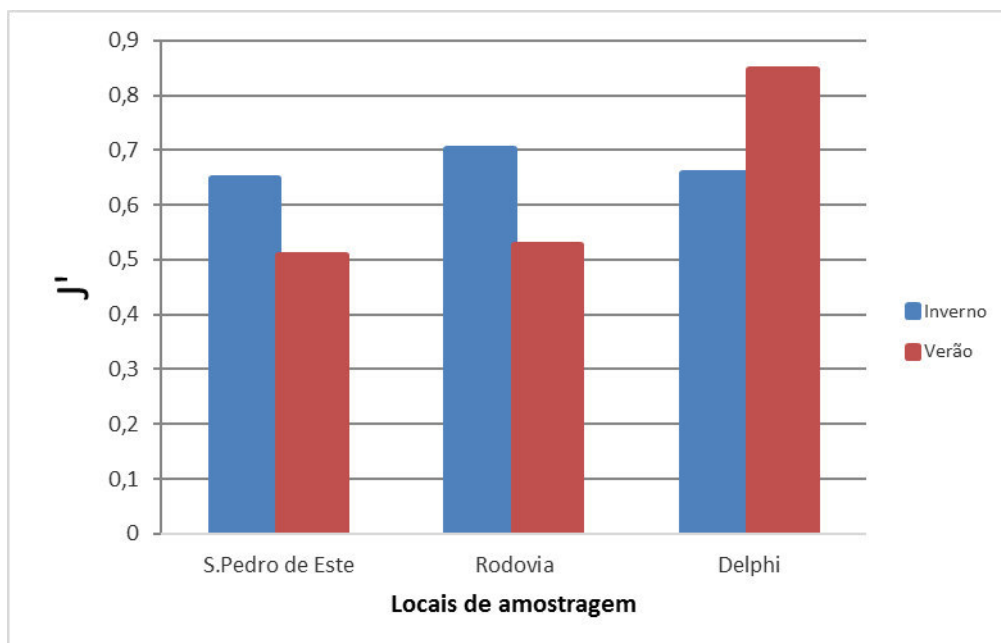


Figura 12: Variação do índice de Pielou ( $J'$ ) das comunidades de macroinvertebrados do rio Este no Inverno de 2015 e no Verão de 2016.

De acordo com a teoria do rio contínuo, esperaríamos encontrar uma alteração dos grupos taxonómicos e uma maior abundância e riqueza em espécies nas zonas de cabeceira e intermedias do rio (Vannote et al., 1980). Contudo, a composição em taxa e os valores das medidas de diversidade encontradas ao longo do troço urbanizado do rio parecem ser mais facilmente atribuídas ao aumento da contaminação da água de montante para jusante.

### 1.3.3. Índices bióticos

O uso de macroinvertebrados como indicadores da qualidade de água de rios é comum e amplamente usada (Castela, Ferreira, & Graça, 2008; Pascoal, Cássio, & Gomes, 2001).

Os resultados obtidos no Inverno de 2015 e no Verão de 2016 (tabela 7) refletiram os dados físico-químicos para os locais em estudo. Verificou-se que o local de S. Pedro de Este era aquele que mostrou melhores resultados a nível dos índices bióticos. Este resultado era o esperado, uma vez que este era o local mais a montante e onde o impacto humano era menos acentuado. Segundo o IBMWP, a água deste local encontrava-se ligeiramente contaminada no Inverno de 2015 e melhorou para não contaminada no Verão

de 2016. No local da Rodovia em que a água foi classificada como moderadamente contaminada no Inverno de 2015 passou para fortemente contaminada no Verão de 2016. A jusante, no local da Delphi a água foi classificada como muito contaminada tanto no Inverno de 2015 como no Verão de 2016.

Os resultados obtidos para o IPT<sub>N</sub> mostraram alguma discrepância na classificação das águas provavelmente porque este índice é mais sensível à deteção de alterações de contaminação da água e por ter sido desenvolvido para ser aplicado em rios do Norte de Portugal (Inag, 2009). A classificação da água em S<sup>o</sup> Pedro de Este passou de razoável no Inverno de 2015 a bom no Verão de 2016. No local da Rodovia e da Delphi a água classificou-se como medíocre nas duas estações do ano.

Segundo o índice EPT todos os locais mostraram uma qualidade de água comprometida sendo os dois locais mais a jusante os que apresentaram piores resultados, classificando-se como severamente impactados nas duas estações do ano. Uma vez que esta métrica está relacionada com a presença de famílias das ordens Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera, muito sensíveis às perturbações do meio aquático (Barbour et al., 1996; Fitzpatrick et al., 2001), era de esperar que o resultados da sua aplicação conduzissem a valores comprometedores

De modo geral, verificou-se que os três locais amostrados possuíam alguma eutrofização ainda que em S. Pedro de Este fosse ligeira em relação aos locais a jusante. Os locais de Rodovia e Delphi eram locais bastante eutrofizados como mostrado pelo resultado das análises físico-químicas e das comunidades de macroinvertebrados bentónicos descritas neste documento.



*Tabela 6: IBMWP (Iberian Biological Monitoring Working Party), IPTIN (Índice Português de Invertebrados dos rios do Norte) e EPT(Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera) no Inverno de 2015 e no Verão de 2016 nos três locais de amostragem no rio Este*

Inverno 2015				Verão 2016		
Índices	S. Pedro de Este	Rodovia	Delphi	S. Pedro de Este	Rodovia	Delphi
<b>IBMWP</b>	Água Ligeiramente Contaminada	Água Moderadamente Contaminada	Água Fortemente Contaminada	Água não Contaminada	Água Fortemente Contaminada	Água muito Contaminada
<b>IPTI<sub>N</sub></b>	Razoável	Medíocre	Medíocre	Bom	Medíocre	Medíocre
<b>EPT</b>	Moderadamente Impactado	Severamente Impactado	Severamente Impactado	Levemente Impactado	Severamente Impactado	Severamente Impactado

### 1.3.4. Grupos Tróficos

No **Inverno de 2015**, verificou-se uma predominância generalizada de coletores de depósito nos 3 locais. Os coletores de depósito alimentam-se de matéria fina particulada (FPOM: 0,45-1mm), resultante da atividade dos trituradores e da abrasão física da matéria orgânica. Estes organismos utilizam a FPOM depositada no leito do rio (Cummins et al., 1989).

Dado que na Rodovia, já existe alguma vegetação nas imediações do rio, permitiu a existência de trituradores que se alimentam de matéria orgânica particulada (CPOM: >1mm) transformando-a em FPOM para os coletores de depósito. Nos locais de S. Pedro de Este e da Rodovia há predominância de macrófitas e briófitas aquáticas o que corrobora os resultados obtidos, verificando-se existência de fitófagos. Os fitófagos alimentam-se essencialmente de matéria vegetal e estão fortemente dependentes da produção autóctone do ecossistema (Merritt & Cummins, 1996). Nos dois primeiros locais observou-se ainda a presença de parasitas como platelmintos e anelídeos. Isto pode dever-se ao facto de o rio nestes locais ser de corrente lenta, tornando a água mais parada e propícia à colonização destes organismos (Figura 13).

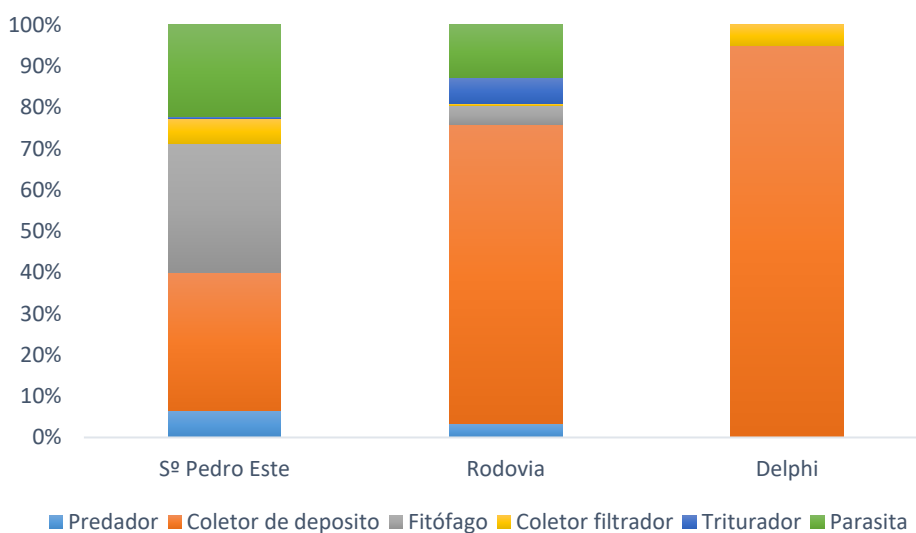


Figura 13: Grupos tróficos (%) presente em cada local de amostragem no Inverno de 2015

No Verão de 2016 houve predominância, tal como no Inverno de 2015, de coletores de depósito. O que seria de esperar uma vez que as características do leito dos locais não se alteraram muito. Verificou-se também um aumento de predadores essencialmente em S. Pedro de Este e em Delphi. Este aumento deveu-se provavelmente ao facto de o número de indivíduos em cada grupo trófico ter aumentado o que levou a um aumento concomitante deste grupo. A percentagem de parasitas também aumentou especialmente nos dois locais mais a jusante (Rodovia e Delphi). Os parasitas podem ser também considerados como predadores na medida em que se alimentam de tecidos vivos (Cummins et al., 1989). Verificou-se uma diminuição generalizada de trituradores devido ao facto de no Verão a floresta ribeirinha não estar no seu período de senescência afetando assim a entrada de CPOM para o sistema ribeirinho o que poderá diminuir a abundância deste grupo trófico (Figura 14).

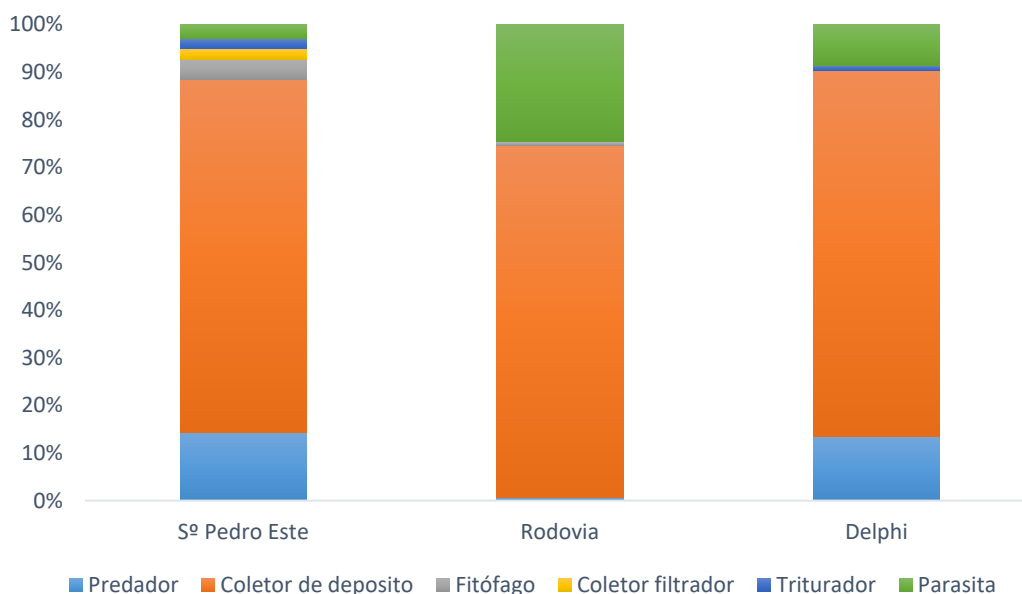


Figura 14: Grupos tróficos (%) presentes em cada local de amostragem no Verão de 2016

Em geral, depois deste estudo verificou-se que os três locais de amostragem contêm perturbações tanto a nível físico-químico, como a nível biológico. O nível de degradação da qualidade da água aumentou à medida que o rio cruza a cidade, sendo o local de S. Pedro de Este o ponto de amostragem que sofre menor perturbação. Este é um local localizado a montante da cidade de Braga, pelo que a agricultura e pecuária são os fatores que mais poderão ter contribuído para as alterações na concentração de nutrientes na água e nas comunidades macrobentónicas. Os locais de Rodovia e Delphi estando localizados dentro da cidade de Braga, são os locais onde a influencia proveniente do fluxo populacional e industrialização da cidade são bem evidentes na qualidade ecológica da água do rio Este. Estes factos verificaram-se tanto para o Inverno de 2015 como para o Verão de 2016. As ordens Oligochaeta e Diptera eram muito abundantes nos locais a jusante (Rodovia e Delphi) o que indica fraca qualidade ecológica da água, uma vez que se trata de organismos tolerantes às alterações do meio.

Os resultados da amostragem no Verão demonstraram que se deu um aumento do número de indivíduos macrobentónicos e, consequentemente, o aumento de indivíduos em cada grupo trófico, em relação ao Inverno. Em trabalhos futuros seria importante aumentar os pontos de amostragem de forma a ter uma perspetiva mais controlada das alterações que vão acontecendo ao longo do rio. Seria ainda relevante aumentar o número de amostragens em cada estação e/ou ainda alargar para o Outono e a Primavera. Desta forma, poder-se-á obter resultados mais precisos e identificar com mais clareza as fontes de perturbação, os locais de ocorrência, e a duração e a magnitude do impacto nas comunidades macrobentónicas presentes no rio Este.



## **2. Potencial de remediação de águas eutrofizadas por fungos aquáticos**



## **2.1. Introdução**

### **2.1.1. Estado ecológico das massas de água**

Aproximadamente  $35 \times 10^{15} \text{ m}^3$  da água presente no Planeta é potável, cerca de 0.3% é água de rios, lagos e albufeiras. A restante é água retida em glaciares, neve permanente e aquíferos (Shiklomanov & Rodda, 2003). Da água disponível, 70% é consumida mundialmente e irrecuperável e, apesar de ser um recurso renovável, este é finito (Pimentel et al., 2004). Devido ao aquecimento global e às atividades humanas, as mudanças na pluviosidade estão a ocorrer e, desta forma, podem surgir impactos significativos na hidrologia das regiões, assim como na disponibilidade de fontes de água potável (Beyene, Lettenmaier, & Kabat, 2010; Clavero, Villero, & Brotons, 2011). A quantidade de água armazenada em rios de todo o mundo é cerca de  $2000 \text{ km}^3$ , muito menos do que a que é retirada anualmente e que corresponde a cerca de  $3800 \text{ km}^3/\text{ano}$  (Oki, 2006). Assim, é muito importante zelar pela boa saúde dos ecossistemas de água doce.

A biodiversidade está gravemente ameaçada em todo mundo devido ao aumento da poluição das fontes de água, nomeadamente dos rios. As alterações causadas nos ciclos de N e P resultaram na eutrofização de rios, lagos e zonas costeiras por todo mundo (Carpenter et al., 1998). A eutrofização tornou-se um problema grave para a qualidade da água (Selman et al., 2008), reduz a biodiversidade e a limitação das populações usufruírem dos serviços do ecossistema provenientes destes ambientes (Liu et al., 2012a). Em resposta ao enriquecimento de nutrientes nas águas, as comunidades de fitoplâncton tornam-se muito abundantes e a decomposição das algas leva à diminuição do oxigénio disponível o que pode provocar a morte de peixes (Carpenter et al., 1998; V. H. Smith, 1998), o aumento da produção primária e a turbidez da água (Droic & Zagorc Koncan, 2002). A eutrofização da água conduz à perda do valor ecológico, estético e económico dos ecossistemas aquáticos (Bennett, Carpenter, & Caraco, 2001). Além de se tornar uma ameaça à saúde pública, a poluição da água implica custos elevados no seu tratamento para a tornar adequada para o consumo humano.

A Directiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, estabelece que os Estados-Membros deverão proteger, melhorar e recuperar as massas de águas superficiais e subterrâneas com o objetivo ambiental de alcançar um BOM ESTADO das águas em



2015. Tal poderá ser atingido quando o estado ecológico e químico de uma massa de água for considerado como, pelo menos, “BOM”. A partir desta diretiva e nos anos subsequentes verificou-se um maior policiamento das entidades competentes e uma crescente preocupação em recuperar a qualidade das massas de água.

### **2.1.2. Os nutrientes e a eutrofização**

O azoto é o elemento mais abundante na atmosfera e o mais importante para o crescimento de plantas e animais. Cerca de 78% do azoto existente no planeta está presente sob a forma de  $N_2$  (azoto não reativo) e apenas 0,002% está presente em tecidos vivos e matéria orgânica (Schlesinger, 1997), sob a forma de azoto inorgânico, como amónia, nitritos e nitratos.

Os sistemas aquáticos contêm formas solúveis de azoto como os nitratos e iões de amónia/amoníaco assim como, o azoto biológico encontrado em proteínas, DNA, RNA e outros componentes que constituem os sistemas vivos. Os seres vivos são importantes na medida em que mantêm o balanço entre as formas reduzidas e oxidadas do azoto. São desta forma peças chave no ciclo deste elemento, uma vez que reduzem os compostos azotados provenientes do ciclo global através de processos de desnitrificação (conversão de nitratos a  $N_2$  e  $N_2O$ ), biossíntese (produção de aminoácidos, DNA, RNA) e fixação de azoto (redução de  $N_2$  em  $NH_3$  pelas bactérias fixadoras de azoto)

As fontes antropogénicas de azoto mais importantes são a agricultura, a indústria e os transportes. Nas últimas décadas, as entradas antropogénicas de azoto nos ecossistemas tanto aquáticos como terrestres têm sido uma causa de crescente preocupação. A amónia é um dos mais importantes produtos gasosos da indústria química, o seu maior uso é em fertilizantes para produção de alimentos e de fibras. Altas concentrações de azoto foram medidas depois da invenção e implementação do processo de Haber-Bosch para produzir  $NH_3$  a partir de  $N_2$  e hidrogénio (Smill & Streatfeild, 2002). Os químicos mais produzidos a partir de  $NH_3$  para fertilizantes são o nitrato de amónia, a ureia, o nitrato de cálcio e o bicarbonato de amónia. A amónia é usada também na indústria têxtil, para produção de nylon e de fibras acrílicas, e em explosivos (Erisman et al., 2007).

Os gases de escape dos automóveis e a combustão industrial a altas temperaturas lançam óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) e dióxido de azoto ( $\text{NO}_2$ ) para a atmosfera. Estes óxidos podem permanecer na atmosfera durante 20 anos, movendo-se lentamente até à estratosfera. Aí, a luz ultravioleta reduz o óxido nitroso a óxido nítrico e oxigénio atómico ( $\text{O}$ ). O oxigénio atómico pode reagir com o oxigénio molecular ( $\text{O}_2$ ) para formar ozono ( $\text{O}_3$ ) ( Smith & Smith, 2007).

Desde meados do século XX que tem vindo a quadruplicar o fluxo de fósforo no ambiente. Os depósitos mais importantes de fósforo são as rochas e os depósitos naturais de fosfato ( Smith & Smith, 2007). O ciclo deste elemento apresenta um fluxo unidirecional com algumas interrupções que consistem na absorção de uma pequena fração pelo biota: mineralização, meteorização, escoamento e escorrência de fósforo particulado e solúvel para o oceano onde vai depositar-se e formar sedimentos.

Nos sistemas aquáticos, tanto de água doce como salgada, o fósforo apresenta-se em três estados: fósforo orgânico particulado, fosfatos orgânicos dissolvidos e fosfatos inorgânicos. Os fosfatos orgânicos são absorvidos rapidamente por todas as espécies de fitoplâncton que, por sua vez, serão ingeridos pelo zooplâncton e outros organismos que se alimentam de detritos. O fósforo que se encontra em compostos orgânicos é utilizado por bactérias que servem de alimento a bacteriófagos, sendo estes os responsáveis pelo retorno de fósforo ao ciclo através da sua excreção (Smith & Smith, 2007). A reciclagem de fósforo inorgânico dá-se quando o ciclo se completa com o surgimento destes sedimentos à superfície, o que poderá demorar entre  $10^7$  e  $10^8$  anos (Smil, 2000). Por sua vez, o P orgânico é reciclado num período de  $10^{-2}$  a  $10^0$  anos através da sua assimilação no solo pelas plantas.

As interferências humanas no ciclo de P consistem no aumento da erosão e lixiviação de florestas e locais de pastagem para darem lugar à expansão da urbanização (Lee, 1990), reciclagem de resíduos orgânicos muito utilizados na agricultura tradicional (Van der Zee & De Haan, 1992), águas residuais não tratadas que resultam num aumento de fósforo devido ao uso de detergentes (Schwuger, 1996) e, por fim, fertilizantes inorgânicos usados em rochas fosfatadas (Sauchelli, 1965).

A carga fluvial de azoto e fósforo aumentou na grande maioria dos rios devido à agricultura intensiva, ao desenvolvimento urbano e industrial e à deposição atmosférica (Howarth et al., 1996). O aumento das concentrações destes elementos afeta

negativamente os processos naturais dentro dos rios e promove mudanças dos ecótipos aquáticos.

Na Europa o aumento de zonas hipóxicas deve-se essencialmente ao excessivo uso de fertilizantes em produções agrícolas (Seitzinger et al., 2010). Os esgotos e as descargas industriais são também dos problemas mais proeminentes, assim como a deposição de N atmosférico devido à combustão de combustíveis fósseis (Metcalf & Eddy, 2003).

Espera-se que entre 2000 e 2050, se nada for feito para minimizar os danos, que o número de rios em todo mundo com alto nível de poluição das suas águas com azoto aumente num cenário mais grave até 38%. Em 1970, este era um problema essencialmente residente em rios europeus, no ano 2000 verificou-se uma abrangência para fora da Europa. Espera-se um cenário semelhante para o fósforo: entre 1970 e 2000 verificou-se um aumento de 25% dos rios contaminados com P comparado com 33% para N no mesmo período. Em 1970 apenas 20% dos rios ultrapassavam os limites aceitáveis para a concentração de N e P, e estima-se agora que até 2050 este valor aumente para 30% (Liu et al., 2012b).

### **2.1.3. Os fungos aquáticos e os nutrientes dissolvidos na água**

Os fungos são ubíquos na biosfera, ocorrendo desde os glaciares ao fundo dos oceanos ( Gessner & Robinson, 2003) e desde as fontes quentes ao gelo polar (Jones, Renaut, & Rosen, 2000). Os fungos são microrganismos que crescem em vários substratos. A maioria dos fungos são compostos por estruturas vegetativas designadas por micélio. Os micélios são constituídos por hifas, que na maioria dos fungos são septadas (Singh, 2006). Os fungos nos ecossistemas decompõem a matéria orgânica, como as folhas, a madeira ou os frutos (Harley, 1971). A decomposição de detritos de plantas envolve uma série de transformações bióticas e abióticas que resultam na formação de dióxido de carbono, substâncias minerais, matéria orgânica dissolvida (DOM), matéria orgânica fina particulada (FPOM), assim como na produção de biomassa de decompositores microbianos como os fungos ( Gessner et al., 1999). Os fungos em associação as plantas em decomposição produzem uma variedade de enzimas extracelulares envolvidas na degradação das paredes celulares das plantas (Gessner, 1980).

Nos rios que atravessam florestas, as fontes disponíveis para os decompositores e consumidores são essencialmente a folhada e os galhos provenientes da vegetação ribeirinha circundante (Webster & Meyer, 1997). Os fungos desempenham funções chave na decomposição de matéria orgânica, transferindo energia e nutrientes para níveis tróficos superiores na cadeia alimentar como os invertebrados detritívoros (Bärlocher, 1982; Fernandes et al., 2014; Gessner et al., 2007). Os fungos mais ativos na decomposição de matéria orgânica nos rios são os hifomicetes aquáticos, este grupo inclui pelo menos 320 espécies (Descals, 2005). Estas espécies de fungos estão bem adaptadas ao ambiente aquático, uma vez que produzem esporos assexuados sigmoides ou tetraradiados que os ajudam a fixar aos substratos nos rios (Webster & Descals, 1981). Estes microrganismos rapidamente colonizam as suas fontes de alimento e rapidamente crescem e produzem esporos, complementando o seu ciclo de vida em apenas algumas semanas. A colonização da folhada pelos hifomicetos tem início com o aprisionamento de conídias à superfície das folhas e em seguida uma rápida germinação das conídias (entre 2h a 6h). Após a sua estabilização, a hifa do fungo estende-se à matriz da folha e atingem-se massas de micélios significativas em algumas semanas (Gessner et al., 2007).

Os fungos aquáticos presentes nos rios podem obter nutrientes inorgânicos (azoto e fósforo) a partir dos detritos vegetais que colonizam e decompõem nos cursos de água, assim como a partir da própria água (Keller Suberkropp & Jones, 1991). As plantas normalmente têm concentrações baixas em N e P o (ou seja, rácio C:N e C:P é alto). De um ponto de vista estequiométrico, um baixo rácio C:N ou C:P resulta num maior crescimento de fungos em substratos, por terem maior disponibilidade em N e P (Stelzer, Heffernan, & Likens, 2003) ou em águas com moderada disponibilidade de N e P (Fernandes et al., 2014)

O efeito dos nutrientes dissolvidos na água na atividade dos fungos e na decomposição mediada por eles nos rios apenas foi reconhecida há cerca de duas décadas (Suberkropp & Chauvet, 1995). O enriquecimento das águas em N e P leva a um aumento da abundância e riqueza de fungos, assim como, a atividade reprodutiva e a decomposição da folhada mediada por estes microrganismos (Gulis & Suberkropp, 2004). O aumento de biomassa de fungos associados à folhada está normalmente correlacionado com o aumento da concentração de azoto, sugerindo uma imobilização deste elemento da água dos rios pelos fungos (Gulis et al., 2006). A concentração de fósforo também aumenta

durante a decomposição concomitante com o aumento da biomassa dos fungos (Gessner et al., 2007).

Tendo em conta o papel dos fungos aquáticos no ciclo dos nutrientes, o estímulo da sua atividade na presença de concentrações moderadas de N e P, e a sua capacidade de imobilizar os nutrientes dissolvidos na água, estes organismos poderão ser potenciais candidatos à remoção de excesso de N e de P das massas de água.

#### **2.1.4. Objetivos**

Esta parte do trabalho teve como objetivo principal testar o potencial dos fungos aquáticos para a remoção/redução de altas concentrações de nutrientes (N e P) na água. A partir dos resultados obtidos nesta experiência espera-se obter uma solução económica e “amiga do ambiente” para a problemática da eutrofização de rios. Com esse intuito foi escolhida uma cultura do hifomiceto aquático *Articulospora tetracladia* Ingold dado que, é uma espécie dominante na decomposição da folhada em rios de Portugal (56–79%, rio Souto; 6–20%, rio Ave; 32–81%, rio Este, (Duarte et al., 2008; Duarte et al., 2009). Bärlocher e Corkum (2003) demonstraram que esta espécie de fungo torna-se dominante em folhas de carvalho quando a concentração de nutrientes dissolvidos na água aumenta. Deste modo, foi escolhido como substrato folhas de carvalho e de plátano com alto rácio C:N e C:P. A experiência decorreu em microcosmos aquáticos contendo folhada e a espécie de fungo selecionada. Os microcosmos foram suplementados com 4 concentrações de N (10, 25, 50 e 100 mg N-NO<sub>3</sub>/L) e uma concentração de P (20mg P-PO<sub>4</sub>/L).

## **2.2. Metodologia**

### **2.2.1. Preparação das folhas**

Folhas de carvalho (*Quercus robur*) e de plátano (*Platanus* sp.) foram recolhidas em Outono de 2007 e 2009, respetivamente. Depois de recolhidas foram transportadas para o laboratório onde foram secas à temperatura ambiente.

Após a secagem, estas foram postas em água desionizada durante 48 horas, com mudanças de água 3 vezes ao dia. Este processo permitiu a lixiviação das folhas de forma a perderem os seus componentes mais recalcitrantes.

No final deste processo, as folhas ficaram aptas a serem cortadas em discos de 12mm com auxílio de um cortador. Foram cortados conjuntos de 40 discos de folhada e colocados em folha de alumínio para posteriormente serem esterilizados.

### **2.2.2. Preparação dos microcosmos**

A experiência foi realizada em condições de assepsia. Assim, o procedimento descrito foi realizado à chama, bem como todos os materiais foram previamente autoclavados. Inicialmente foram autoclavados 14,5L de água do Fastio (água com propriedades químicas muito semelhante à água dos rios de nascente do norte de Portugal) e 90 matrizes de 150ml. A cada matriz foram adicionados 50 ml da água e conjuntos de 40 discos de folha anteriormente cortados e esterilizados. Dos 90 matrizes, 45 foram usados para colocar as folhas de carvalho e os restantes para as folhas de plátano. No final, obtivemos 9 microcosmos de cada concentração de nitratos N-NO<sub>3</sub>), nomeadamente 0,5 mg/L (controlo, sem adição de nutrientes), 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L e 100 mg/L de azoto. Aos tratamentos de adição de nitrato, foi adicionada uma concentração de fósforo (P-PO<sub>4</sub>) final de 20 mg/L.

Duas semanas antes do início da experiência foram feitas culturas em placa com extrato de malte 1% de *Articulospora tetracladia* (Figura 15 A). Depois deste período de tempo, foram cortados 5 pedaços de cultura de cada placa e colocados em tubos de Falcon. A estes foram adicionados 30 ml de água estéril antes de serem colocados em gelo. Na

preparação do inóculo recorreu-se ao homogeneizador IKA ULTRA TURRAX T25 Digital (Figura 15 B) a uma rotação de 11 rpm, durante 5 segundos, 4 vezes em cada Falcon alternados entre si. Desta mistura retirou-se 1ml e adicionou-se a cada um dos microcosmos. Por fim, todos os microcosmos foram colocados num agitador orbital (Infors TR-225 HT (+AK-82)) a 140 rpm a uma temperatura de 16°C durante 15 dias.

A cada 5 dias, foram retiradas 3 réplicas de cada concentração (Figura 16) para quantificação da perda de massa de folha e da biomassa de fungos. Aos restantes microcosmos, foi renovado o meio de cultura por um novo. Em cada réplica a que se procedia a mudança do meio, foram retirados 10 ml de meio e transferidos para tubos Falcon e 2 ml para Eppendorfs previamente etiquetados. Este material foi imediatamente congelado a -20°C para posteriormente quantificação do seu conteúdo em N e P. Os discos de folhas dos microcosmos foram lavados com 50 ml de água desionizada, guardados em folha de alumínio etiquetados e congelados a -80°C, para mais tarde se quantificar a decomposição foliar e a biomassa de fungos.

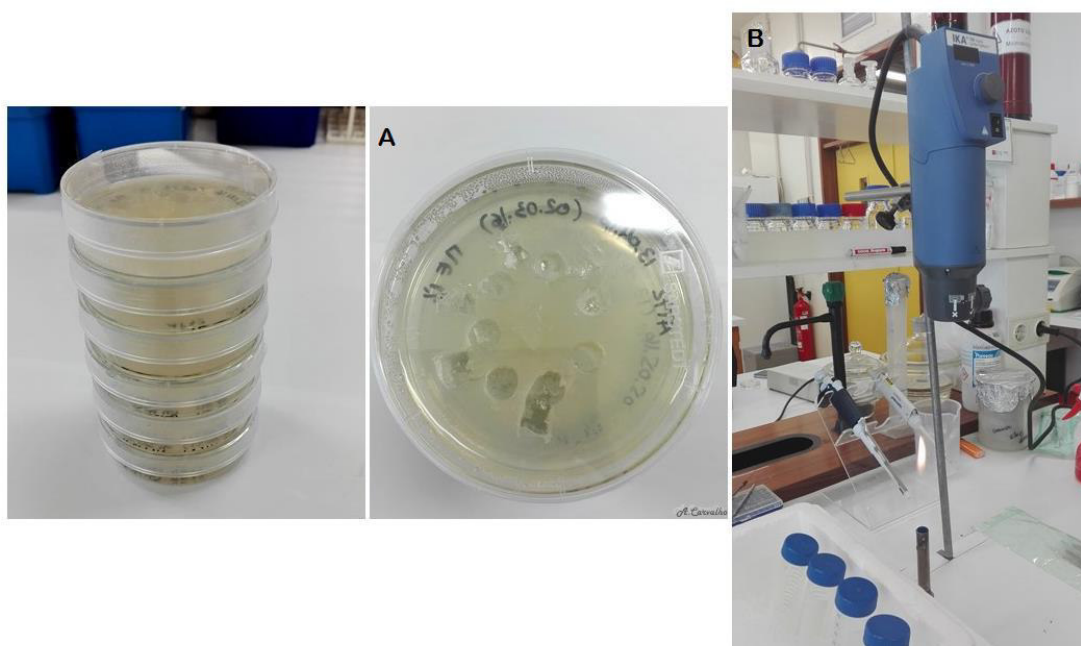


Figura 15: Placas de cultura de *Articulospora tetracladia* (A), Homogeneização do inóculo de fungo (B)



*Figura 16: Troca de meios realizados em ambiente estéril*

### **2.2.3. Decomposição da folhada**

Os discos de cada microcosmo foram congelados no final da experiência e guardados – 80°C antes de serem liofilizados (Chris alfa 2.4,B.Braun Melsungen (Germany)) ( $\pm 48h$ ). Seguidamente, as folhas foram retiradas e pesadas numa balança analítica ( $\pm 0001g$ ). Foram também pesadas folhas que não foram usadas na experiência de forma a obter o peso inicial. A massa decomposta da folhada foi determinada através da equação  $p_i - p_f$  ( $p_i$ - peso inicial e  $p_f$ - peso final).

### **2.2.4. Biomassa de Fungos**

Foram usados conjuntos de 6 discos liofilizados de cada tratamento para determinar a concentração de ergosterol presente nas folhas, como medida da biomassa de fungos (Gessner, 2005). Os lípidos foram extraídos das folhas por aquecimento (80°C) durante 30 min em 8 g/L de KOH/metanol e purificados por extração de fase sólida. O ergosterol foi eluído com isopropanol, e depois purificado e quantificado a 282 nm por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC; UltiMate 3000 LC Systems, Thermo



Scientific, CA, USA ) numa coluna LiChrospher RP18, usando metanol como fase móvel (33°C, 1,4 ml/min).

### **2.2.5. Quantificação dos nutrientes nas folhas**

Foram usados conjuntos de 6 discos liofilizados de cada tratamento para determinar a concentração de ergosterol presente nas folhas, como medida da biomassa de fungos (Gessner, 2005). Os lípidos foram extraídos das folhas por aquecimento (80°C) durante 30 min em 8 g/L de KOH/metanol e purificados por extração de fase sólida. O ergosterol foi eluído com isopropanol, e depois purificado e quantificado a 282 nm por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC; UltiMate 3000 LC Systems, Thermo Scientific, CA, USA ) numa coluna LiChrospher RP18, usando metanol como fase móvel (33°C, 1,4 ml/min).

### **2.2.6. Análise estatística de dados**

Para testar o efeito da concentração de nutrientes e do tempo na perda de massa foliar, na biomassa de fungos nas folhas e imobilização de nutrientes da água na folhas por parte dos fungos, foi aplicada uma two-way ANOVA, seguida de comparações múltiplas de Tukey (Zar, 2009). A análise foi efetuada no Prism 5.0 para Windows (Prism, 2011). Os resultados dos dois tipos de folhada foram analisados separadamente.

## **2.3. Resultados e Discussão**

### **2.3.1. Perda de massa da folhada:**

Os dados de perda de massa da folhada na presença de um gradiente de N ao longo de 15 dias de experiência, para os dois tipos de folha apresentam-se nas Figura 18 (carvalho) e Figura 17 (plátano). Após 15 dias, as folhas de carvalho tinham perdido 14% (controlo – 0,5 mg/L), 15% (10 mg/L), 16 % (25 mg/L), 11% (50 mg/L) e 10 % (100 mg/L). As folhas de plátano tinham perdido 11% (controlo- 0,5 mg/L), 3% (10 mg/L), 4% (25 mg/L), 3% (50mg/L) e 14% (100 mg/L). Verificou-se que o tempo foi o fator que mais influenciou a perda de massa foliar ao longo da experiência (ANOVA,  $p < 0,05$ ) para as folhas de carvalho. No entanto, não se verificou efeito significativo da concentração de azoto ou de fósforo na perda de massa das folhas (ANOVA,  $p > 0,05$ ), tanto para carvalho como para o plátano.

Verificou-se uma decomposição foliar mais acentuada nas folhas de carvalho em relação às de plátano, ainda que não haja diferenças significativas. Alguns estudos apontam para uma relação entre a qualidade das folhas e a sua decomposição mediada pelos fungos (Ferreira & Chauvet, 2011; Schindler & Gessner, 2009). Resultados da literatura indicam que a decomposição foliar é mais acelerada quanto menor o teor em lenhina (Fernandes et al., 2012) ou o rácio C/N (Fernandes et al., 2014; Melillo et al., 1984). Assim, esperávamos que a perda de massa foliar tivesse sido mais acentuada no caso da folha de carvalho, uma vez que contem maior concentração de N e menor conteúdo em lenhina (Fernandes et al 2012; 2014)

Estudos anteriores, demonstraram que a perda de massa da folhada nomeadamente de carvalho foi significativamente afetada pela concentração em N (gradiente até 5 mg/L N-NO<sub>3</sub>), no entanto, não foi afetada pela concentração em P (gradiente até 0,3 mg/L P-PO<sub>4</sub>) (Fernandes et al., 2014). No nosso estudo, as diferentes concentrações em N não afetaram significativamente a perda de massa foliar tanto para carvalho como para plátano, o que poderá estar relacionado com o facto de as concentrações usadas serem muito superiores às do estudo em questão. Ainda assim, a concentração de P também não teve um efeito significativo na perda de massa da folhada.

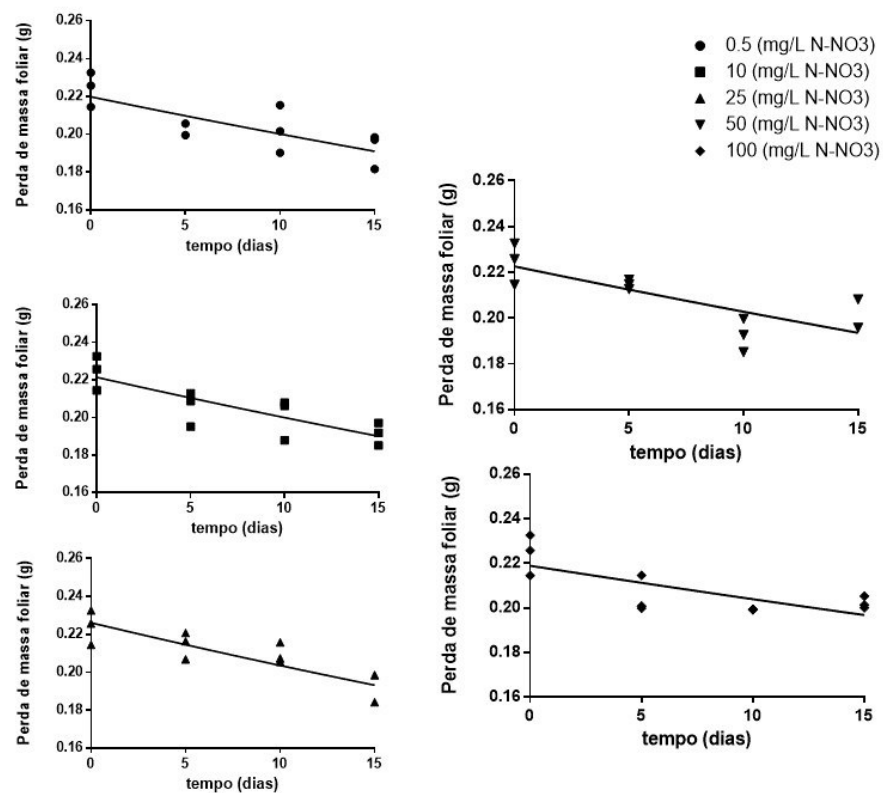


Figura 18: Perda de massa foliar ao longo de 15 dias de experiência em microcosmos com folhas de carvalho (*Quercus robur*) inoculadas com o fungo *A. Tetracladia* na presença de concentrações crescentes de  $N-NO_3$ . Os símbolos representam as concentrações (mg/L) testadas (0,5;10;25;50 e 100)

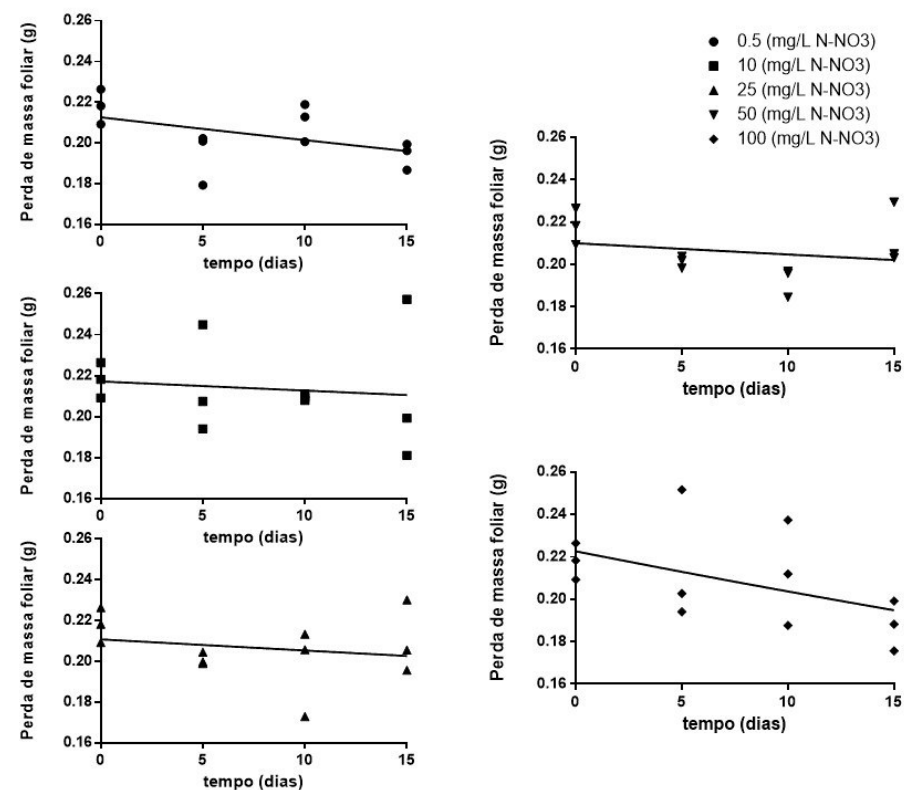


Figura 17: Perda de massa foliar ao longo de 15 dias de experiência em microcosmos com folhas de plátano (*Platanus sp.*) inoculadas com o fungo *A. Tetracladia* na presença de concentrações crescentes de  $N-NO_3$ . Os símbolos representam as cinco concentrações (mg/L) testadas (0,5;10;25;50 e 100)

### 2.3.2. Biomassa de Fungos

Na Figura 19 é apresentado o efeito da concentração de N-NO<sub>3</sub> na biomassa de *A.tetracladia* durante os 15 dias de experiência. Verificou-se que a biomassa fúngica associada às folhas de carvalho foi afetada significativamente pela concentração de azoto ao longo do tempo (ANOVA,  $p<0,05$ ). No entanto, para as folhas de plátano apenas o tempo teve influencia na biomassa do fungo (ANOVA,  $p<0,05$ ), não estando dependente das concentrações de azoto usadas (ANOVA,  $p>0,05$ ).

Verificou-se que as folhas de carvalho tendem a ser mais rapidamente colonizadas pelo fungo, como revelado pelo aumento gradual da biomassa fúngica ao longo do tempo. No final do estudo (15 dias), verificou-se que nos microcosmos de concentrações mais baixas de azoto (10 e 25 mg/L N-NO<sub>3</sub>) tinham maior quantidade de biomassa fúngica rondando os 800 µg de ergosterol/mg de peso seco de folha. Outro estudo efetuado com folhas de carvalho e amieiro mostrou que a biomassa de comunidades de fungos é maior em folhas de carvalho e que aumenta como o aumento da concentração de N até 0,5 mg/L N-NO<sub>3</sub> (Fernandes et al., 2014). No nosso estudo, verificou-se um aumento da biomassa do fungo *A. tetracladia* até pelo menos 25 mg/L N-NO<sub>3</sub>. Verificou-se ainda que altas concentrações de N (50 e 100 mg/L N-NO<sub>3</sub>) reduziam significativamente a biomassa do fungo presente nas folhas dos microcosmos. Este efeito era de esperar uma vez que o aumento de nutrientes nas águas estimula a atividade dos microrganismos apenas até um determinado nível onde atinge o seu pico máximo (Gulis, Ferreira, & Graça, 2006) e que altas concentrações de nutrientes podem tornar-se tóxicas para os microrganismos afetando os processos biológicos (Camargo & Alonso, 2006; Woodward et al., 2012).

Quanto às folhas de plátano, verificou-se que no final de 15 dias a quantidade máxima de fungos foi cerca de 400 µg de ergosterol/mg de peso seco de folha, cerca de metade da quantidade obtida nas folhas de carvalho no mesmo período de tempo. Estes dados vêm corroborar os resultados anteriores de perda de massa, uma vez que se verificou uma menor perda de massa da folhada de plátano relativamente à de carvalho, ainda que não seja significativa, provavelmente devido à menor colonização pelos fungos.

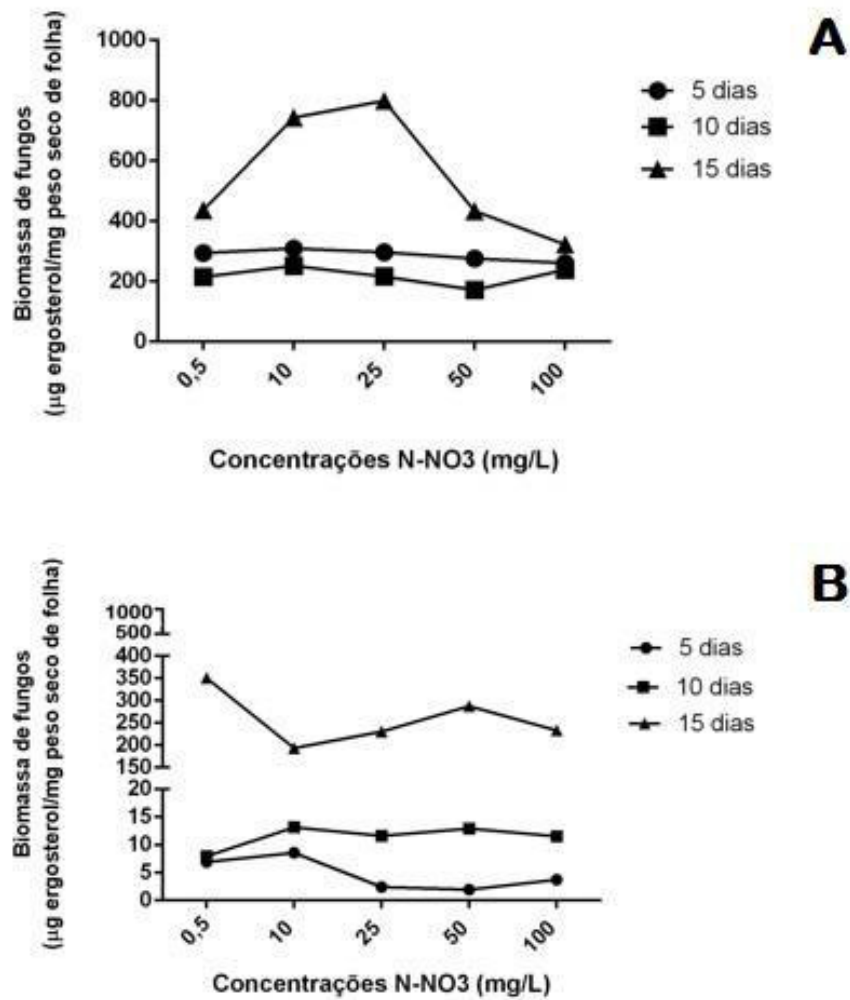


Figura 19: Biomassa produzida ( $\mu\text{g}$  ergosterol/mg peso seco de folha) pelo fungo *Articulospora tetracladia* em microcosmos com folhada e diferentes concentrações de azoto ( $\text{N-NO}_3$ ) ao longo de 15 dias de experiência. Folhas de carvalho (A), folhas de plátano (B)

### 2.3.3. Dinâmica de nutrientes

Na Figura 20 são apresentados os resultados obtidos da dinâmica de nutrientes (N e P) durante 15 dias de experiência. Valores abaixo da linha tracejada são valores de incorporação do nutriente pelos microrganismos, acima desta linha são valores de mineralização.

Segundo os dados de biomassa de fungos, optou-se por analisar as amostras de água de 15 dias apenas nas folhas de carvalho, uma vez que, foram estas que mostraram maior biomassa associada de fungos. Seria de esperar que uma maior biomassa fúngica fosse mais eficaz na remoção de nutrientes nas águas. Seria também de esperar que as folhas de carvalho, sendo as menos recalcitrantes e onde o teor de lenhina é baixo, a imobilização de N fosse maior (Melillo et al., 1984). Como as folhas de carvalho possuem menor teor em N e P (Lecerf et al., 2007; Schindler & Gessner, 2009) seria de esperar também que a incorporação de N fosse maior, dado que a cultura de *A. tetracladia* na falta de azoto na folha iria obtê-lo a partir da água para o seu crescimento (Fernandes et al., 2014).

Pela análise da Figura 20, verifica-se que, aos 15 dias, apenas na concentração de 0,5 mg/L N-NO<sub>3</sub> (controlo) houve incorporação de nutrientes no fungo, ou seja remoção de azoto e de fósforo da água. Em todas as outras concentrações deu-se libertação/mineralização dos nutrientes. Verificou-se que existem diferenças entre as concentrações (ANOVA,  $p < 0,05$ ), no entanto, estas diferenças apenas estão patentes em relação ao controlo (0,5 mg/L N- NO<sub>3</sub>). Vários estudos reportam que o azoto possui um padrão trifásico, que consiste na lixiviação de N das folhas seguido de imobilização de N pelos micróbios, seguindo-se a fase de mineralização (Ball et al., 2009; Moore et al., 2006). A dinâmica do fósforo é mais variável, contudo, apresenta o mesmo padrão trifásico (Prescott, 2005).

Foram também analisadas amostras de água aos 10 dias para as concentrações de 10mg/L e 50 mg/L de N-NO<sub>3</sub>. Os resultados obtidos demonstraram que nestas concentrações houve uma remoção eficaz de nutrientes (N e P) da água. No entanto, não foi possível retirar conclusões claras dado que apenas temos resultados destas duas concentrações. Os microcosmos com as concentrações de 10 mg/L e de 50 mg/L foram aqueles onde se observou maior eficácia na remoção de N e P na água. Ainda que aos 15

dias haja alguma libertação de N e P, são as que mais se aproximam da linha a tracejado que seria o limite máximo de incorporação (100%).

Seria importante num trabalho futuro, analisar o comportamento dos microrganismos aos 5 dias, uma vez que, nesta altura os fungos já estão em crescimento e para tal necessitam de mais nutrientes para se desenvolverem e, provavelmente, será a altura em que a remoção de N e P nas águas poderá ser maior. Será ainda interessante num futuro próximo avaliar a atividade dos fungos nas restantes concentrações aos 10 dias de forma a poder tirar conclusões mais claras, que não foi possível apenas com as duas concentrações analisadas neste estudo. Poderá ser, ainda, relevante analisar os dados das folhas de plátano principalmente aos 15 dias, uma vez que, pelo demonstrado nos dados de decomposição foliar e da biomassa de fungos, possuem um comportamento semelhante ao das folhas de carvalhos ao fim de 5 dias. O crescimento dos fungos nas folhas de plátano é mais tardio do que nas folhas de carvalho, o que a longo termo poderá contribuir para o aumento da eficiência na remoção de nutrientes em águas eutrofizadas.

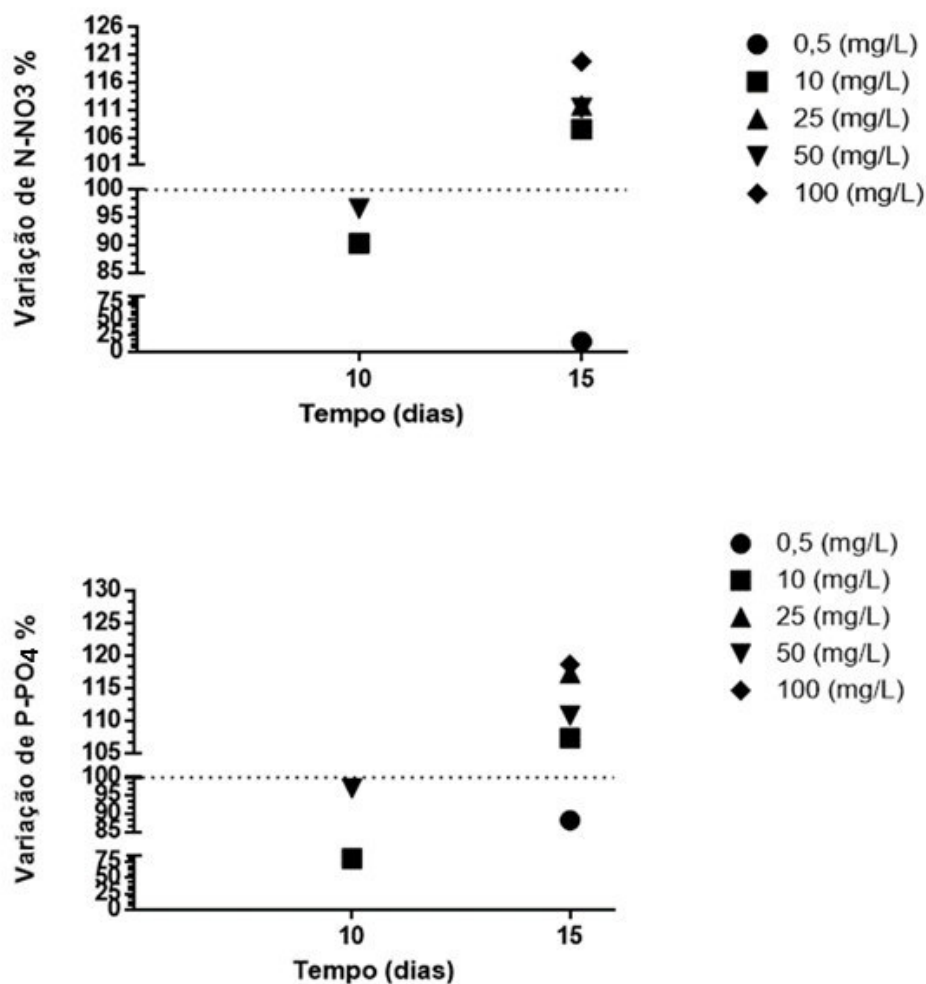


Figura 20: Resultados da variação (%) de N-NO<sub>3</sub> e P-PO<sub>4</sub> nas águas dos microcosmos com folhada inoculada com o fungo *A. tetradia* para as concentrações testadas aos 10 e 15 dias respetivamente. A linha a tracejado (100%) significa a incorporação/remoção máxima de nutrientes das águas pelos microrganismos, abaixo desta existe remoção e acima desta existe libertação de nutrientes. Salientar ainda que aos 10 dias só foram analisadas duas amostras





### **3. Considerações Finais**



A água é um bem essencial à vida e, como tal, deve ser mantida em boas condições. No entanto, devido ao desenvolvimento da indústria e práticas de má gestão, este recurso tem vindo a sofrer um declínio na sua qualidade (Shiklomanov, 1998; Saunders et al., 2002). Os principais problemas resultantes das atividades humanas nas bacias hidrográficas são o assoreamento e homogeneização do leito de rios, a diminuição da diversidade de habitats e micro-habitats e a eutrofização proveniente do aumento das concentrações de fósforo e azoto na água dos rios (Goulart & Callisto, 2003).

A Diretiva Europeia do Quadro de Água (DQA) (Directiva 2000/60/CE, 2000) é o principal instrumento da Política da União Europeia relativo à água e estabelece um quadro de ação comunitária para a proteção de águas superficiais, de transição, costeiras e subterrâneas. Em Portugal, a Agência Portuguesa do Ambiente (APA) é a entidade responsável pela implementação desta diretiva.

Na sequência de problemas de poluição aquática que se têm arrastado ao longo dos anos na bacia hidrográfica do rio Ave, é relevante realizar ações de biomonitorização e desenvolver medidas de mitigação de problemas de contaminação dos rios, nomeadamente em troços com influencia urbana.

O estudo realizado neste trabalho consistiu em avaliar a qualidade ecológica de 3 locais selecionados num troço urbanizado do rio Este, um tributário do rio Ave, que atravessa a cidade de Braga. O estudo decorreu em duas estações do ano (inverno de 2015 e verão de 2016) e foram medidos parâmetros físico-químicos e parâmetros biológicos através da amostragem de macroinvertebrados. Os resultados sugerem que a nível de parâmetros físico-químicos estes estão de acordo com Decreto lei n.º 236/98, de 1 de Agosto onde são impostos os limites recomendáveis e máximos de nutrientes para águas superficiais. No entanto, verificou-se que a condutividade, e a concentração de  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_3$  e  $\text{PO}_4$  aumentavam ao longo do troço do rio de montante para jusante. O local de S. Pedro de Este estava a ser afetado essencialmente por resíduos provenientes da agricultura e alguma pecuária evidente naquele local. Nos locais da Rodovia e Delphi deu-se um aumento de condutividade e dos nutrientes na água devido ao facto destes locais já se situarem dentro da cidade o que promove a contaminação devido à circulação automóveis, alguma indústria existente junto ao canal do rio, e resíduos resultantes da grande densidade de habitantes (Smith & Smith, 2007).

O uso de métricas com macroinvertebrados para avaliação da qualidade de água de rios é comum e amplamente usada (Castela et al., 2008; Pascoal et al., 2001). Os índices

aplicados neste estudo indicaram que os locais com maior concentração de amónio, nitratos e fosfatos eram aqueles que apresentavam menor abundância de organismos e menor riqueza taxonómica, como é o caso da Rodovia e da Delphi. Nestes locais predominavam grupos faunísticos tolerantes à contaminação por excesso de nutrientes, como é o caso de Oligochaeta e Chironomidae (Callisto et al., 2005; Moreno & Callisto, 2004). Verificou-se também que não houve alteração desta tendência nestes locais entre estações do ano.

Por sua vez, o local de S. Pedro de Este foi aquele que possuía melhores resultados biológicos o que permitiu classifica-lo como ligeiramente impactado segundo o índice biótico IBMWP e como razoável / bom de acordo com o IPTIN. O facto da quase inexistência de bosque ribeirinho também é uma agravante para o tipo de comunidades bentónicas de cada local, uma vez que a vegetação riparia está diretamente relacionada com os processos biológicos do sistema ribeirinho e do rio (Graça, 2001; Lecerf et al., 2005). O tipo de substrato também influencia do tipo de organismos presente nos locais. Verificou-se que os coletores de depósito eram os grupos tróficos que mais predominavam nos pontos de amostragem tanto no Inverno de 2015 como no Verão de 2016, ainda que nesta estação a sua abundância diminua. Os coletores alimentam-se de matéria fina particulada presente no rio (Cummins et al., 1989) proveniente da transformação da pouca vegetação riparia existente ao longo do curso.

Em suma, este estudo permitiu concluir que o rio Este antes de atravessar a cidade de Braga apresentava uma qualidade ecológica moderada nomeadamente em S. Pedro de Este. No entanto, à medida que o rio atravessa a cidade verificou-se uma degradação da qualidade da sua água, como mostrado pela análise dos parâmetros físico-químicos e dos parâmetros biológicos. O resultado da análise dos três índices bióticos indicaram que a qualidade da água estava deteriorada, apesar dos esforços já efetuados pela Câmara Municipal de Braga nos últimos anos (Green Savers, 2015). Assim, é importante continuar a monitorizar a qualidade da água do rio Este de forma a perceber se os esforços já efetuados estão efetivamente a trazer melhorias ecológicas do sistema ribeirinho. É preciso ainda garantir a fiscalização e aumentar a vigilância para eventuais descargas de poluentes, tema abordado várias vezes pelos meios de comunicação sociais locais (CMJornal, 2016). Ainda que tenha havido melhorias ao longo dos anos, há que envolver os cidadãos de forma a obter uma melhor qualidade daquilo que nos é mais precioso e que todos dependemos – a água.

As alterações causadas pelo Homem nos ciclos de N e P resultaram na eutrofização de rios, lagos e zonas costeiras por todo mundo (Carpenter et al., 1998). A carga de azoto e de fósforo aumentou na grande maioria dos rios devido à agricultura intensiva, desenvolvimento urbano e industrial e à deposição atmosférica (Howarth et al., 1996). O aumento das concentrações destes elementos afeta negativamente a biodiversidade e os processos naturais dos rios.

A segunda parte deste trabalho de tese consistiu no uso de uma cultura pura de *Articulospora tetracladia* com o intuito de verificar o seu potencial para a diminuição do excesso de nutrientes (N e P) em águas de rio, usando como substrato folhas de carvalho e de plátano. Verificou-se ao final de 15 dias de experiência que as diferentes concentrações de nutrientes (0,5;10;25;50;100mg/L N-NO<sub>3</sub>) não afetaram a perda de massa foliar tanto em folhas de carvalho como em folhas de plátano, sendo o tempo o único fator que influenciava a perda de massa foliar. Ainda assim, verificou-se que nas folhas de carvalho deu-se uma perda de massa de folha mais visível ao longo do tempo do que nas folhas de plátano. Alguns estudos apontam para uma relação entre a qualidade das folhas e a sua decomposição mediada pelos fungos (Ferreira & Chauvet, 2011; Schindler & Gessner, 2009). Tem sido demonstrado que quanto maior o teor em lenhina e menor o teor em azoto nas folhas, menor será a decomposição foliar (Fernandes et al., 2012; 2014).

Os resultados de biomassa de fungos demonstram que as folhas de carvalho são mais rapidamente colonizadas por este fungo do que as folhas de plátano. Ao final de 15 dias de experiência, as folhas de carvalho obtiveram cerca do dobro de biomassa de fungos em relação às de plátano. Nas folhas de carvalho as concentrações mais altas (50 e 100 mg/L N-NO<sub>3</sub>) tiveram efeitos de inibição na biomassa fúngica.

Os dados da dinâmica de nutrientes demonstraram que, após 15 dias a crescer nas folhas de carvalho, os microrganismos já estavam em fase de mineralização, não sendo possível verificar a capacidade dos fungos na incorporação de nutrientes. No entanto, os resultados de 10 dias para as concentrações de 10 mg/L e 50 mg/L N-NO<sub>3</sub> demonstraram que houve incorporação de azoto e de fósforo pela cultura de *A. tetracladia* muito próxima de 100%. Contudo, não é possível tirar conclusões mais claras devido ao facto de só terem sido analisadas duas concentrações.

Em suma, ainda que, não tenha sido possível verificar com rigor a capacidade dos fungos removerem os nutrientes da água, verificou-se que para concentrações intermédias

de nutrientes o fungo *A. tetracladia* tem potencial para ser usado em estratégias de remediação de águas eutrofizadas. A implementação de estudos in situ seriam importantes para avaliar se o comportamento potencial demonstrado por esta cultura de fungos aquáticos é o mesmo em laboratório e no campo.

## **4. Referências bibliográficas**



- Alba-Tercedor, J. (1996). Macroinvertebrados Acuáticos y Calidad de las Aguas de los Ríos. *Simposio Del Agua En Andalucía, II*, 203–213.
- Antunes, B. (2013). Impactos do cobre e do metalaxil-M em cadeias tróficas detritívoras em ribeiros. Retrieved from <https://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/29416#>
- ARH Tejo. (2012). Plano de Gestão de Região Hidrográfica do Tejo. Relatório Técnico. Resumo Não Técnico. Agosto 2012. Retrieved from [http://sniamb.apambiente.pt/infos/geoportaldocs/Planos/PGRH5-TEJO/RNT%5CPGRHTEjo\\_RNT.pdf](http://sniamb.apambiente.pt/infos/geoportaldocs/Planos/PGRH5-TEJO/RNT%5CPGRHTEjo_RNT.pdf)
- Ball, B. A., Bradford, M. A., & Hunter, M. D. (2009). Nitrogen and phosphorus release from mixed litter layers is lower than predicted from single species decay. *Ecosystems*, 12(1), 87–100. <http://doi.org/10.1007/s10021-008-9208-2>
- Barbour, M. T., Gerritsen, J., Griffith, 3GE, Frydenborg, R., McCarron, E., White, J. S., & Bastian, M. L. (1996). A framework for biological criteria for Florida streams using benthic macroinvertebrates. *Journal of the North American Benthological Society*, 15(2), 185–211.
- Barbour, M. T., Gerritsen, J., Snyder, B. D., & Stribling, J. B. (1999). Rapid bioassessment protocols for use in streams and Wadeable rivers. *USEPA, Washington*.
- Barbour, M. T., Swietlik, W. F., Jackson, S. K., Courtemanch, D. L., Davies, S. P., & Yoder, C. O. (2000). *Measuring the attainment of biological integrity in the USA: a critical element of ecological integrity*. Springer.
- Bärlocher, F. (1982). Conidium production from leaves and needles in four streams. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 60(June), 1487–1494. <http://doi.org/10.1139/b82-190>
- Bärlocher, F., & Corkum, M. (2003). Nutrient enrichment overwhelms diversity effects in leaf decomposition by stream fungi. *Oikos*, 101(November 2002), 247–252. <http://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2003.12372.x>
- Bennett, E. M., Carpenter, S. R., & Caraco, N. F. (2001). Human Impact on Erodeable Phosphorus and Eutrophication: A Global Perspective. *BioScience*, 51(3), 227. [http://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0227:HIOEPA\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0227:HIOEPA]2.0.CO;2)
- Beyene, T., Lettenmaier, D. P., & Kabat, P. (2010). Hydrologic impacts of climate change on the Nile River Basin: Implications of the 2007 IPCC scenarios. *Climatic Change*, 100(3), 433–461. <http://doi.org/10.1007/s10584-009-9693-0>
- Braga, P. I. O. D. E. (2008). *Relatório Da Avaliação Da Execução Do Pdmb*.
- Brookes, A., & Shields, F. D. (1996). *River channel restoration: guiding principles for sustainable projects*. Wiley Chichester.
- Callisto, M., Gonçalves, J. F., & Moreno, P. (2005). Invertebrados Aquáticos como Bioindicadores. *Callisto, M.; Gonçalves, J. F. Jr.; Moreno, P. Invertebrados Aquáticos Como Bioindicadores. Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. 2005.*, 12.
- Camargo, J. A., & Alonso, Á. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic

- nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International*, 32(6), 831–849. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2006.05.002>
- Campbell, D. E. (2000). Using energy systems theory to define, measure, and interpret ecological integrity and ecosystem health. *Ecosystem Health*, 6(3), 181–204.
- Carina, A., & Portela, S. (2014). Contribuição para a avaliação da integridade ecológica do rio Sabor ( Bacia do Douro , NE Portugal ).
- Carpenter, S., Caraco, N., Correll, D. ., Howarth, R. W., Sharpley, A. N., & Smith, V. H. (1998). Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecological Application*, 8(January 1998), 559–568. [http://doi.org/10.1890/1051-0761\(1998\)008\[0559:NPOSWW\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1890/1051-0761(1998)008[0559:NPOSWW]2.0.CO;2)
- Castela, J., Ferreira, V., & Graça, M. A. S. (2008). Evaluation of stream ecological integrity using litter decomposition and benthic invertebrates. *Environmental Pollution*, 153(2), 440–449. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.08.005>
- Clarke, R. T., Wright, J. F., & Furse, M. T. (2003). RIVPACS models for predicting the expected macroinvertebrate fauna and assessing the ecological quality of rivers. *Ecological Modelling*, 160(3), 219–233.
- Clavero, M., Villero, D., & Brotons, L. (2011). Climate Change or Land Use Dynamics: Do We Know What Climate Change Indicators Indicate? *Plos One*, 6, 8. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0018581>
- CMJornal. (2016). Descargas continuam a poluir rio Este em Braga - Cidades - Correio da Manhã. Retrieved April 19, 2017, from <http://www.cmjornal.pt/portugal/detalhe/descargas-continuum--a-poluir-rio-este-em-braga>
- Cummins, K. W., Wilzbach, M. A., Gates, D. M., Perry, J. B., & Taliaferro, W. B. (1989). Shredders and Riparian Vegetation. *BioScience*, 39(1), 24–30. <http://doi.org/10.2307/1310804>
- Descals, E. (2005). Diagnostic characters of propagules of Ingoldian fungi. *Mycological Research*, 109(5), 545–555. <http://doi.org/10.1017/S0953756205002728>
- Directiva 2000/60/CE. (2000). Directiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Outubro de 2000. Retrieved June 30, 2015, from <http://www.apambiente.pt/dqa/index.html>
- Drolc, A., & Zagorc Koncan, J. (2002). Estimation of sources of total phosphorus in a river basin and assessment of alternatives for river pollution reduction. *Environment International*, 28(5), 393–400. [http://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00062-4](http://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00062-4)
- Duarte, S. (2008). Biodiversity and activity of microbial decomposers of leaf litter in streams under anthropogenic stress.
- Duarte, S., Bärlocher, F., Trabulo, J., Cássio, F., & Pascoal, C. (2014). Stream-dwelling fungal decomposer communities along a gradient of eutrophication unraveled by 454 pyrosequencing. *Fungal Diversity*, 70(1), 127–148. <http://doi.org/10.1007/s13225-014-0300-y>
- Duarte, S., Pascoal, C., & Cássio, F. (2008). High diversity of fungi may mitigate the impact of pollution on plant litter decomposition in streams. *Microbial Ecology*,

- 56(4), 688–695. <http://doi.org/10.1007/s00248-008-9388-5>
- Duarte, S., Pascoal, C., Garabétian, F., Cássio, F., & Charcosset, J. Y. (2009). Microbial decomposer communities are mainly structured by trophic status in circumneutral and alkaline streams. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19), 6211–6221. <http://doi.org/10.1128/AEM.00971-09>
- Erisman, J. W., Bleeker, A., Galloway, J., & Sutton, M. S. (2007). Reduced nitrogen in ecology and the environment. *Environmental Pollution*. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.033>
- Feio, M. J., & Dolédec, S. (2012). Integration of invertebrate traits into predictive models for indirect assessment of stream functional integrity: A case study in Portugal. *Ecological Indicators*, 15(1), 236–247. <http://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.09.039>
- Fernandes, I., Pascoal, C., Guimarães, H., Pinto, R., Sousa, I., & Cássio, F. (2012). Higher temperature reduces the effects of litter quality on decomposition by aquatic fungi. *Freshwater Biology*, 57(11), 2306–2317. <http://doi.org/10.1111/fwb.12004>
- Fernandes, I., Seena, S., Pascoal, C., & Cássio, F. (2014). Elevated temperature may intensify the positive effects of nutrients on microbial decomposition in streams. *Freshwater Biology*, 59(11), 2390–2399. <http://doi.org/10.1111/fwb.12445>
- Ferreira, V., & Chauvet, E. (2011). Future increase in temperature more than decrease in litter quality can affect microbial litter decomposition in streams. *Oecologia*, 167(1), 279–291. <http://doi.org/10.1007/s00442-011-1976-2>
- Fitzpatrick, F. A., Scudder, B. C., Lenz, B. N., & Sullivan, D. J. (2001). Effects Of Multi-Scale Environmental Characteristics On Agricultural Stream Biota In Eastern Wisconsin. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association*, 37(6), 1489–1507. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Fonseca, T. M. P. (2011). Monitorização da Qualidade Biológica de Rios baseada nos Macroinvertebrados e Requalificação Fluvial dirigida a Populações Piscícolas Monitorização da Qualidade Biológica de Rios baseada nos Macroinvertebrados e Requalificação Fluvial dirigida a População. *Dissertação Apresentada À Escola Superior Agrária de Bragança Para Obtenção Do Grau de Mestre Em Tecnologia Ambiental, Instituto*.
- Francisco, N., & Silva, D. a. (2007). Universidade do Minho Francisco da Silva Costa A gestão das Águas Públicas — O caso da Bacia Hidrográfica do Rio Ave no período 1902-1973 Tese de Doutoramento em Geografia Ramo de Geografia Física e Estudos Ambientais Trabalho efectuado sob a orientação d.
- Gessner, M. O. (2005). Ergosterol as a measure of fungal biomass. In *Methods to Study Litter Decomposition: A Practical Guide* (pp. 189–195). [http://doi.org/10.1007/1-4020-3466-0\\_25](http://doi.org/10.1007/1-4020-3466-0_25)
- Gessner, M. O., & Chauvet, E. (1993). Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(2), 502–507.
- Gessner, M. O., & Chauvet, E. (2002). A case for using litter breakdown to assess functional stream integrity. *Ecological Applications*, 12(2), 498–510. [http://doi.org/10.1890/1051-0761\(2002\)012\[0498:ACFULB\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1890/1051-0761(2002)012[0498:ACFULB]2.0.CO;2)
- Gessner, M. O., Chauvet, E., & Dobson, M. (1999). Nordic Society Oikos A Perspective

- on Leaf Litter Breakdown in Streams. *Source: Oikos*, 85(2), 377–384. <http://doi.org/10.2307/3546505>
- Gessner, M. O., Gulis, V., Kuehn, K. a, Chauvet, E., & Suberkropp, K. (2007). 17 Fungal Decomposers of Plant Litter in Aquatic Ecosystems. *Environmental and Microbial Relationships*, 301–324. [http://doi.org/10.1007/978-3-540-71840-6\\_17](http://doi.org/10.1007/978-3-540-71840-6_17)
- Gessner, M. O., & Newell, S. Y. (2002). Biomass, growth rate, and production of filamentous fungi in plant litter. *Manual of Environmental Microbiology*, 2, 390–408.
- Gessner, M. O., & Robinson, C. T. (2003). Aquatic hyphomycetes in alpine streams. In *Ecology of a Glacial Floodplain* (pp. 123–137).
- Gessner, R. V. (1980). Degradative enzyme production by salt-marsh fungi. *Botanica Marina*, 23(2), 133–139.
- Gomes, P., Pascoal, C., Faria, A. M., Pinho, M., Soares, N. N., Leite, A. S., & Botelho, A. C. (2001). Património natural da Bacia do Ave.
- Goulart, M. D. C., & Callisto, M. (2003). Bioindicadores de Qualidade de Água como Ferramenta em Estudos de Impacto Ambiental. *Revista Da FAPAM*, 2(1), 9.
- Graça, M. A. S. (2001). The role of invertebrates on leaf litter decomposition in streams—a review. *International Review of Hydrobiology*, 86(4–5), 383–393. [http://doi.org/10.1002/1522-2632\(200107\)86:4/5<383::AID-IROH383>3.0.CO;2-D](http://doi.org/10.1002/1522-2632(200107)86:4/5<383::AID-IROH383>3.0.CO;2-D)
- Green Savers. (2015). Green Savers – Braga: primeira fase da reabilitação do Rio Este já foi concluída (com FOTOS). Retrieved April 19, 2017, from <http://greensavers.sapo.pt/2015/03/31/braga-primeira-fase-da-reabilitacao-do-rio-este-ja-foi-concluida-com-fotos/>
- Gulis, V., Ferreira, V., & Graça, M. A. S. (2006). Stimulation of leaf litter decomposition and associated fungi and invertebrates by moderate eutrophication: implications for stream assessment. *Freshwater Biology*, 51(9), 1655–1669. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2006.01615.x>
- Gulis, V., Kuehn, K., & Suberkropp, K. (2006). The role of fungi in carbon and nitrogen cycles in freshwater ecosystems. In *Fungi in biogeochemical cycles* (Vol. 24, pp. 404–435). <http://doi.org/10.1556/AMicr.46.1999.2-3.6>
- Gulis, V., & Suberkropp, K. (2004). Effects of whole-stream nutrient enrichment on the concentration and abundance of aquatic hyphomycete conidia in transport. *Mycologia*, 96(1), 57–65.
- Harley, J. L. (1971). Fungi in Ecosystems. *Journal of Applied Ecology*, 8(3), 627–642. <http://doi.org/10.2307/2402673>
- Hauer, F. R., & Resh, V. H. (1996). Benthic macroinvertebrates. *Methods in Stream Ecology*. Academic Press, San Diego, CA.
- Hering, D., Buffagni, A., Moog, O., Sandin, L., Sommerhäuser, M., Stubauer, I., ... Skoulidakis, N. (2003). The development of a system to assess the ecological quality of streams based on macroinvertebrates—design of the sampling programme within the AQEM project. *International Review of Hydrobiology*, 88(3–4), 345–361.

- Howarth, R. W., Billen, G., Swaney, D., Townsend, A., Jaworski, N., Lajtha, K., ... Zhu, Z. L. (1996). Regional nitrogen budgets and riverine N&P fluxes for the drainages to the North Atlantic Ocean: Natural and human influences. *Biogeochemistry*, 35(1), 75–139. <http://doi.org/10.1007/bf02179825>
- INAG. (2008). Protocolo de amostragem e análise para os macroinvertebrados bentônicos, 17.
- Inag, I. P. (2008). Tipologia de rios em Portugal continental no âmbito da implementação da directiva quadro da água. I - Caracterização abiótica. *Ministério Do Ambiente, Do Ordenamento Do Território E Do Desenvolvimento Regional, Instituto Da Água, IP*.
- Inag, I. P. (2009). Critérios para a Classificação do Estado das Massas de Água Superficiais–Rios e Albufeiras. *Ministério Do Ambiente, Do Ordenamento Do Território E Do Desenvolvimento Regional. Instituto Da Água, IP*.
- Inc, Rs. (2015). RStudio: integrated development for R. *RStudio, Inc., Boston, MA* URL <Http://www.Rstudio.Com>.
- Ingold, C. T. (1942). Aquatic hyphomycetes of decaying alder leaves. *Transactions of the British Mycological Society*, 25(4), 339–IN6. [http://doi.org/10.1016/S0007-1536\(42\)80001-7](http://doi.org/10.1016/S0007-1536(42)80001-7)
- Jones, B., Renaut, R. W., & Rosen, M. R. (2000). Stromatolites Forming in Acidic Hot-Spring Waters, North Island, New Zealand. *Palaios*, 15(5), 450–475. [http://doi.org/10.1669/0883-1351\(2000\)015<0450:SFAHS>2.0.CO;2](http://doi.org/10.1669/0883-1351(2000)015<0450:SFAHS>2.0.CO;2)
- Julivert, M., Fontboté, J. M., Ribeiro, A., & Conde, L. N. (1974). Memoria explicativa del Mapa Tectónico de la Península Ibérica y Baleares E. 1: 1. 000. 000: Instituto Geológico y Minero de España: 1-113. Madrid.
- Lecerf, A., Dobson, M., Dang, C. K., & Chauvet, E. (2005). Riparian plant species loss alters trophic dynamics in detritus-based stream ecosystems. *Oecologia*, 146(3), 432–442. <http://doi.org/10.1007/s00442-005-0212-3>
- Lecerf, A., Patfield, D., Boiché, A., Riipinen, M. P., Chauvet, E., & Dobson, M. (2007). Stream ecosystems respond to riparian invasion by Japanese knotweed (*Fallopia japonica*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 64(9), 1273–1283. <http://doi.org/10.1139/f07-092>
- Lecerf, A., Risnoveanu, G., Popescu, C., Gessner, M. O., & Chauvet, E. (2007). Decomposition of diverse litter mixtures in streams. *Ecology*, 88(1), 219–227. [http://doi.org/10.1890/0012-9658\(2007\)88\[219:DODLMI\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1890/0012-9658(2007)88[219:DODLMI]2.0.CO;2)
- Lee, L. K. (1990). The dynamics of declining soil erosion rates. *Journal of Soil and Water Conservation*, 45(6), 622–624.
- Liu, C., Kroeze, C., Hoekstra, A. Y., & Gerbens-Leenes, W. (2012a). Past and future trends in grey water footprints of anthropogenic nitrogen and phosphorus inputs to major world rivers. *Ecological Indicators*, 18, 42–49. <http://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.10.005>
- Liu, C., Kroeze, C., Hoekstra, A. Y., & Gerbens-Leenes, W. (2012b). Past and future trends in grey water footprints of anthropogenic nitrogen and phosphorus inputs to major world rivers. *Ecological Indicators*, 18, 42–49.

<http://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.10.005>

- Lotze, F. (1945). Zur gliederung der varisziden der Iberischen Meseta. *Geotektonische Forschungen*, 6, 78–92.
- Melillo, J. M., Naiman, R. J., Aber, J. D., & Linkins, A. E. (1984). Factors controlling mass loss and nitrogen dynamics of plant litter decaying in northern streams. *Bulletin of Marine Science*.
- Merritt, R. W., & Cummins, K. W. (1996). *An introduction to the aquatic insects of North America*. Kendall Hunt.
- Metcalf, E., & Eddy, H. (2003). *Wastewater engineering: treatment and reuse. Wastewater Engineering, Treatment, Disposal and Reuse. Tchobanoglous G, Burton FL, Stensel HD (eds). Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited, 4th edition. New Delhi, India.* [http://doi.org/10.1016/0309-1708\(80\)90067-6](http://doi.org/10.1016/0309-1708(80)90067-6)
- Moore, T. R., Trofymow, J. A., Prescott, C. E., Fyles, J., & Titus, B. D. (2006). Patterns of carbon, nitrogen and phosphorus dynamics in decomposing foliar litter in Canadian forests. *Ecosystems*, 9(1), 46–62. <http://doi.org/10.1007/s10021-004-0026-x>
- Moreno, P., & Callisto, M. (2004). Bioindicadores de qualidade de água ao longo da bacia do rio das velhas (MG). *Bioindicadores de Qualidade de Água*, 95–116.
- Munné, A., Solá, C., & Prat, N. (1998). QBR: Un índice rápido para la evaluación de la calidad de los ecosistemas de ribera. *Freshwater Ecology and Management*.
- Naiman and, R. J., & Décamps, H. (1997). The Ecology of Interfaces: Riparian Zones. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28(1), 621–658. <http://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.28.1.621>
- Newell, S. Y. (1992). Estimating fungal biomass and productivity in decomposing litter. *Mycology Series USA*, 3, 521–561. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=1993/US/US93083.xml;US9322766>
- Oki, T. and S. K. (2006). Global Hydrological Cycles and World Water Resources. *Science*, 313(August), 1068–1072. <http://doi.org/10.1126/science.1128845>
- Oliveira, S. V., & Cortes, R. M. V. (2006). Environmental indicators of ecological integrity and their development for running waters in northern Portugal. *Sites The Journal Of 20Th Century Contemporary French Studies*, 25, 479–498.
- Pascoal, C., Cássio, F., & Gomes, P. (2001). Leaf breakdown rates: A measure of water quality? *International Review of Hydrobiology*, 86(4–5), 407–416. [http://doi.org/10.1002/1522-2632\(200107\)86:4/5<407::AID-IROH407>3.0.CO;2-P](http://doi.org/10.1002/1522-2632(200107)86:4/5<407::AID-IROH407>3.0.CO;2-P)
- Pimentel, D., Berger, B., Filiberto, D., Newton, M., Wolfe, B., Karabinakis, E., ... Nandagopal, S. (2004). Water Resources: Agricultural and Environmental Issues. *BioScience*, 54(10), 909–918. [http://doi.org/10.1641/0006-3568\(2004\)054\[0909:WRAAEI\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1641/0006-3568(2004)054[0909:WRAAEI]2.0.CO;2)
- Prescott, C. E. (2005). Decomposition and mineralization of nutrients from litter and humus. In *Nutrient Acquisition by Plants* (pp. 15–41). Springer.
- Prism, G. (2011). GraphPad Prism Software. Versão.

- Reynoldson, T. B., Bailey, R. C., Day, K. E., & Norris, R. H. (1995). Biological guidelines for freshwater sediment based on Benthic Assessment of Sediment (the BEAST) using a multivariate approach for predicting biological state. *Australian Journal of Ecology*, 20(1), 198–219.
- Sauchelli, V. (1965). Phosphates in agriculture. *Phosphates in Agriculture*.
- Saunders, D. L., Meeuwig, J. J., & Vincent, C. J. (2002). Freshwater Protected Areas: Strategies for Conservation Áreas Protegidas de Agua Dulce: Estrategias para la Conservación. *Conservation Biology*, 16(1), 30–41. <http://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2002.99562.x>
- Schindler, M. H., & Gessner, M. O. (2009). Functional leaf traits and biodiversity effects on litter decomposition in a stream. *Ecology*, 90(6), 1641–1649. <http://doi.org/10.1890/08-1597.1>
- Schlesinger, W. H. (1997). Biogeochemistry: an analysis of global change -- 2nd ed. *Academic Press, San Diego*, 139–143.
- Schofield, N. J., & Davies, P. E. (1996). Measuring the health of our rivers. *Water-Melbourne then Artarmon-*, 23, 39–43.
- Schwuger, M. J. (1996). *Detergents and the Environment*. CRC Press.
- Seitzinger, S. P., Mayorga, E., Bouwman, A. F., Kroeze, C., Beusen, A. H. W., Billen, G., ... Harrison, J. A. (2010). Global river nutrient export: A scenario analysis of past and future trends. *Global Biogeochemical Cycles*, 24(2). <http://doi.org/10.1029/2009GB003587>
- Selman, M., Greenhalgh, S., Díaz, R. J., & Sugg, Z. (2008). Eutrophication and hypoxia in coastal areas: a global assessment of the state of knowledge. *WRI Policy Note*, 1, 6pp.
- Shiklomanov, I. a. (1998). World Water Resources. A new appraisal and assessment for the 21st century. *United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization*, 40.
- Shiklomanov, I. A., & Rodda, J. C. (2003). World Water Resources at the Beginning of the Twenty-First Century. *Cambridge University Press (UK)*, 452.
- Simpson, J. C., Norris, R. H., Wright, J. F., Sutcliffe, D. W., & Furse, M. T. (2000). Biological assessment of river quality: development of AUSRIVAS models and outputs. In *Assessing the biological quality of fresh waters: RIVPACS and other techniques. Proceedings of an International Workshop held in Oxford, UK, on 16-18 September 1997*. (pp. 125–142). Freshwater Biological Association (FBA).
- Singh, H. (2006). *Mycoremediation: Fungal Bioremediation*. *Mycoremediation: Fungal Bioremediation*. <http://doi.org/10.1002/0470050594>
- Smil, V. (2000). Phosphorus in the environment: Natural flows and human interferences. *Annual Review of Energy and the Environment*, 25(1), 53–88. <http://doi.org/10.1146/annurev.energy.25.1.53>
- Smill, V., & Streatfeild, R. A. (2002). Enriching the earth: Fritz Haber, Carl Bosch, and the transformation of world food production. *Electronic Green Journal*. <http://doi.org/10.1353/tech.2002.0114>

- Smith, T. M., & Smith, R. L. (2007). *Ecología*. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=AdPSNAAACAAJ&pgis=1>
- Smith, V. H. (1998). Cultural Eutrophication of Inland, Estuarine, and Coastal Waters. In *Successes, Limitations, and Frontiers in Ecosystem Science* (pp. 7–49). [http://doi.org/10.1007/978-1-4612-1724-4\\_2](http://doi.org/10.1007/978-1-4612-1724-4_2)
- StatSoft. (2007). Statistica version 8.0, data analysis software system. Retrieved from [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)
- Statzner, B., Bonada, N., & Dolédec, S. (2008). Conservation of taxonomic and biological trait diversity of European stream macroinvertebrate communities: a case for a collective public database. In *Biodiversity and Conservation in Europe* (pp. 367–390). Springer.
- Stelzer, R. S., Heffernan, J., & Likens, G. E. (2003). The influence of dissolved nutrients and particulate organic matter quality on microbial respiration and biomass in a forest stream. *Freshwater Biology*, 48(11), 1925–1937. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2003.01141.x>
- Suberkropp, K., & Chauvet, E. (1995). Regulation of leaf breakdown by fungi in streams: Influences of water chemistry. *Ecology*, 76(5), 1433–1445. <http://doi.org/10.2307/1938146>
- Suberkropp, K., & Jones, E. O. (1991). Organic phosphorus nutrition of some aquatic hyphomycetes. *Mycologia*, 83(5), 665–668.
- Swan, C. M., Healey, B., & Richardson, D. C. (2008). The role of native riparian tree species in decomposition of invasive tree of heaven (*Ailanthus altissima*) leaf litter in an urban stream. *Ecoscience*, 15(1), 27–35. [http://doi.org/10.2980/1195-6860\(2008\)15\[27:TRONRT\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.2980/1195-6860(2008)15[27:TRONRT]2.0.CO;2)
- Tachet, H., Bournaud, M., & Richoux, P. (1987). Introduction à l'étude des macroinvertébrés des eaux douces (systématique élémentaire et aperçu écologique) = Introduction to the study of the fresh water macroinvertebrates (elementary systematics and ecological survey). Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=9436209>
- Van der Zee, S., & De Haan, F. A. M. (1992). Environmental issues of fertiliser use in The Netherlands. *Proc. Fertiliser Soc.*, 324, 1–28.
- Vannote, R. L., Minshall, G. W., Cummins, K. W., Sedell, J. R., & Cushing, C. E. (1980). The River Continuum Concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37(1), 130–137. <http://doi.org/10.1139/f80-017>
- Violle, C., Navas, M.-L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., & Garnier, E. (2007). Let the concept of trait be functional! *Oikos*, 116(5), 882–892. <http://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2007.15559.x>
- Webster, J., & Descals, E. (1981). Morphology, distribution, and ecology of conidial fungi in freshwater habitats. *Biology of Conidial Fungi (USA)*.
- Webster, J. R., & Meyer, J. L. (1997). Organic matter budgets for streams: a synthesis. *Journal of the North American Benthological Society*, 16(1), 141–161. <http://doi.org/10.2307/1468247>



- Woodward, G., Gessner, M. O., Giller, P. S., Gulis, V., Hladyz, S., Lecerf, A., ... Chauvet, E. (2012). Continental-Scale Effects of Nutrient Pollution on Stream Ecosystem Functioning. *Science*, 336(6087), 1438–1440. <http://doi.org/10.1126/science.1219534>
- Zar, J. H. (1996). Biostatistical Analysis 3rd edn Prentice-Hall. *Upper Saddle River, NJ*.
- Zar, J. H. (2009). Biostatistical Analysis, 5th. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River.

# **Anexos**

Tabela A1: Identificação e abundancia de taxa amostrados em Inverno de 2015

<b>TAXA</b>		<b>S. PEDRO DE ESTE</b>	<b>RODOVIA</b>	<b>DELPHI</b>	<b>TOTAL</b>
<b>ACHETES</b>	<b>Hirudidae</b>	1	7	0	<b>8</b>
<b>OLIGOCHAETA</b>	<b>Tubificidae</b>	70	2	0	<b>72</b>
<b>OLIGOCHAETA</b>	<b>Lumbriculidae</b>	0	90	2	<b>92</b>
<b>OLIGOCHAETA</b>	<b>Lumbricidae</b>	0	32	0	<b>32</b>
<b>GASTROPODA</b>	<b>Physidae</b>	121	1	0	<b>122</b>
<b>GASTROPODA</b>	<b>Planorbidae</b>	3	10	0	<b>13</b>
<b>GASTROPODA</b>	<b>Lymnaeidae</b>	3	0	0	<b>3</b>
<b>DIPTERA</b>	<b>Chironomidae</b>	68	32	6	<b>106</b>
<b>DIPTERA</b>	<b>Simuliidae</b>	18	1	2	<b>21</b>
<b>DIPTERA</b>	<b>Tipulidae</b>	2	0	0	<b>2</b>
<b>DIPTERA</b>	<b>Rhagionidae</b>	2	1	0	<b>3</b>
<b>DIPTERA</b>	<b>Anthomyidae</b>	1	0	0	<b>1</b>
<b>PLECOPTERA</b>	<b>Chloroperlidae</b>	1	0	0	<b>1</b>
<b>ODONATA</b>	<b>Libellulidae</b>	6	0	0	<b>6</b>
<b>ODONATA</b>	<b>Cordulegasteridae</b>	1	0	0	<b>1</b>
<b>ODONATA</b>	<b>Corduliidae</b>	1	0	0	<b>1</b>
<b>ODONATA</b>	<b>Calopterygidae</b>	15	0	0	<b>15</b>
<b>TRICHOPTERA</b>	<b>Hidropsychidae</b>	7	0	0	<b>7</b>
<b>TRICHOPTERA</b>	<b>Hydroptilidae</b>	2	0	0	<b>2</b>
<b>EPHEMEROPTERA</b>	<b>Baetidae</b>	0	15	30	<b>45</b>
<b>EPHEMEROPTERA</b>	<b>Oligoneuridae</b>	0	0	5	<b>5</b>
<b>TRICLADIA</b>	<b>Planariidae</b>	92	0	0	<b>92</b>
<b>TRICLADIA</b>	<b>Dugesiidae</b>	0	30	0	<b>30</b>
<b>AMPHIPODA</b>	<b>Gammaridae</b>	0	2	0	<b>2</b>
	<b>Total</b>	<b>414</b>	<b>223</b>	<b>45</b>	

Tabela A2: Identificação e abundância de taxa amostrados em Verão de 2016

<b>TAXA</b>		<b>S. PEDRO DE ESTE</b>	<b>RODOVIA</b>	<b>DELPHI</b>	<b>TOTAL</b>
<b>OLIGOCHAETA</b>	<b>Lumbriculidae</b>	14	0	0	<b>14</b>
	<b>Lumbricidae</b>	20	7	61	<b>88</b>
<b>GASTROPODA</b>	<b>Physidae</b>	14	0	0	<b>14</b>
	<b>Birthynidae</b>	0	1	0	<b>1</b>
	<b>Lymnaeidae</b>	5	0	0	<b>5</b>
<b>DIPTERA</b>	<b>Chrironamidae</b>	315	101	19	<b>435</b>
	<b>Dixidae</b>	2	0	0	<b>2</b>
	<b>Simuliidae</b>	10	0	0	<b>10</b>
	<b>Ceratopogonidae</b>	4	0	0	<b>4</b>
	<b>Tabanidae</b>	11	0	0	<b>11</b>
	<b>Athericidae</b>	7	0	9	<b>16</b>
	<b>Limoniidae</b>	5	0	0	<b>5</b>
<b>HEMIPTERA</b>	<b>Nepidae</b>	1	0	0	<b>1</b>
<b>ODONATA</b>	<b>Gomphidae</b>	0	1	0	<b>1</b>
	<b>Libellulidae</b>	43	0	0	<b>43</b>
	<b>Aeschnidae</b>	1	0	0	<b>1</b>
	<b>Calopterygidae</b>	3	0	5	<b>8</b>
<b>TRICHOPTERA</b>	<b>Psychomyiidae</b>	1	0	0	<b>1</b>
	<b>Limnephilidae</b>	3	0	0	<b>3</b>
	<b>Polycentropodidae</b>	1	0	0	<b>1</b>
	<b>Sericostomatidae</b>	2	0	1	<b>3</b>
<b>EPHEMEROPTERA</b>	<b>Baetidae</b>	21	0	0	<b>21</b>
	<b>Caenidae</b>	2	0	0	<b>2</b>
<b>LEPIDOPTERA</b>	<b>Parapoynx</b>	1	0	0	<b>1</b>
<b>COLEOPTERA</b>	<b>Hylipidae</b>	4	0	0	<b>4</b>
<b>HETEROPTERA</b>	<b>Hydrometridae</b>	1	0	0	<b>1</b>
<b>HYMENOPTERA</b>	<b>Agriotypidae</b>	1	0	0	<b>1</b>
<b>TRICLADIA</b>	<b>Crenobia</b>	15	36	9	<b>60</b>
<b>ANOSTRACA</b>	<b>Triopsidae</b>	0	1	0	<b>1</b>
<b>NEMERTIDA</b>	Mermithoidea	1	1	0	<b>2</b>
<b>ARACHNIDA</b>	<b>Acarina</b>	0	2	4	<b>6</b>
	<b>Total</b>	<b>508</b>	<b>150</b>	<b>108</b>	

Tabela A3: Índice de Qualidade do Bosque Ribeirinho – QBR ((Munné et al., 1998)

Grau de cobertura da zona ripária		Pontuação entre 0 e 25		
Pontuação				
25	>80% de cobertura vegetal na zona ripária (as plantas anuais não são contabilizadas)			
10	50-80% de cobertura vegetal na zona ripária			
5	10-50% de cobertura vegetal na zona ripária			
0	<10% de cobertura vegetal na zona ripária			
+10	Se a conectividade entre o bosque de ribeira e o ecossistema florestal adjacente é total			
+5	Se a conectividade entre o bosque de ribeira e o ecossistema florestal adjacente é maior que 50%			
-5	Se a conectividade entre o bosque de ribeira e o ecossistema florestal adjacente é entre 25 e 50%			
-10	Se a conectividade entre o bosque de ribeira e o ecossistema florestal adjacente é menor que 25%			
Estrutura da cobertura vegetal (contabiliza-se toda a zona de ribeira)		Pontuação entre 0 e 25		
Pontuação				
25	cobertura de árvores superior a 75%			
10	cobertura de árvores entre 50 e 75%, ou cobertura de árvores entre 25 e 50% e de arbustos superior a 25%			
5	cobertura de árvores inferior a 50% e o resto da cobertura efectuada por arbustos entre os 10 e os 25%			
0	sem árvores e arbustos abaixo dos 10%			
+10	Se na zona de inundação a concentração de helófitos ou arbustos é superior a 50%			
+5	Se na zona de inundação a concentração de helófitos ou arbustos é entre 25 e 50%			
+5	Se existe uma boa conexão entre a zona de arbustos e árvores coma a zona de bosque adjacente			
-5	Se existe uma distribuição regular dos pés de árvores e o bosque é superior a 50%			
-5	Se as árvores e os arbustos se distribuem em manchas, sem continuidade			
-10	Se existe uma distribuição regular das árvores e dos arbustos e o bosque é inferior a 50%			
Qualidade da cobertura vegetal (depende do tipo geomorfológico da zona de ribeira)		Pontuação entre 0 e 25		
Pontuação		Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
25	número de espécies diferentes de árvores autóctones	>1	>2	>3
10	número de espécies diferentes de árvores autóctones	1	2	3
5	número de espécies diferentes de árvores autóctones	-	1	1-2
0	sem árvores autóctones			
+10	se existe uma continuidade da comunidade ao longo do rio uniforme e ocupando mais de 75% da zona de ribeira			
+5	se existe uma continuidade da comunidade ao longo do rio uniforme e ocupando entre 50 a 75% da zona de ribeira			
+5	Se existe uma disposição em galeria das diferentes comunidades			
+5	Se o número de espécies diferentes é:	>2	>3	>4
-5	Se existem estruturas construídas pelo homem			
-5	Se existe alguma árvore introduzida isolada			
-10	Se existem espécies de árvores introduzidas formando comunidades			
-10	Se existem descargas de efluentes			
Grau de naturalidade do canal fluvial		Pontuação entre 0 e 25		
Pontuação				
25	O canal do rio não está modificado			
10	Modificações das zonas adjacentes ao rio com redução do canal			
5	Sinais de alteração e estruturas rígidas intermitentes que modificam o canal do rio			
0	Rio canalizado na totalidade do sector			
-10	Se existe alguma estrutura sólida dentro do leito do rio			
-10	Se existe alguma represa ou outra infra-estrutura transversal no leito do rio			

Tabela A4: Pontuação das famílias para o cálculo do IBMWP (Alba-Tercedor, 1996)

Famílias	Pontuação
Siphonuridae, Heptageniidae, Leptophlebiidae, Potamanthidae, Ephemeridae, Taeniopterygidae, Leuctridae, Capniidae, Perlodidae, Perlidae, Chloroperlidae, Aphelocheiridae, Phryganeidae, Molannidae, Beraeidae, Odontoceridae, Leptoceridae, Goeridae, Lepidostomatidae, Brachycentridae, Seriscostomatidae, Athericidae, Blephariceridae	10
Astacidae, Lestidae, Calopterygidae, Gomphidae, Cordulegasteridae, Aeshnidae, Corduliidae, Libellulidae, Psychomyiidae, Philopotamidae, Glossomatidae	8
Ephemerellidae, Prosopistomatidae, Nemouridae, Gripopterygidae, Rhyacophilidae, Polycentropodidae, Limnephelidae, Ecnomidae, Hydrobiosidae, Pyralidae, Psephenidae	7
Neritidae, Viviparidae, Ancylidae, Thiaridae, Hydroptilidae, Unionidae, Mycetopodidae, Hyriidae, Corophilidae, Gammaridae, Hyalellidae, Atyidae, Palaemonidae, Trichodactylidae, Platycnemididae, Coenagrionidae, Leptohyphidae	6
Oligoneuridae, Polymitarcyidae, Dryopidae, Elmidae, Helophoridae, Hydrochidae, Hydraenidae, Clambidae, hydropsychidae, Tipulidae, Simuliidae, Planariidae, Dendrocoelidae, Dugesiiidae	5
Aeglidae, Baetidae, Caenidae, Haliplidae, Curculionidae, Chrysomelidae, Tabanidae, Stratyiomyidae, Empididae, Dolichopodidae, Dixidae, Ceratopogonidae, Anthomyidae, Limoniidae, Psychodidae, Sciomyzidae, Rhagionidae, Sialidae, Corydalidae, Piscicolidae, Hydracarina	4
Mesoveliidae, Hydrometridae, Gerridae, Nepidae, Naucoridae, Pleidae, Notonectidae, Corixidae, Veliidae, Helodidae, Hydrophilidae, Hygrobiidae, Dytiscidae, Gyrrinidae, Valvatidae, Hydrobiidae, Lymnaeidae, Physidae, Planorbidae, Bithyniidae, Bythinellidae, Sphaeridae, Glossiphonidae, Hirudidae, Erpobdellidae, Asellidae, Ostracoda	3
Chironomidae, Culicidae, Ephydriidae, Thaumaleidae	2
Oligochaeta, Syrphidae	1

Tabela A5: Mediana dos valores de referência e fronteiras para os diferentes tipos de rios de Portugal Continental

Tipos de Rios	Índice adoptado	Valor de Referência	Exc./Bom (RQE)	Bom/Raz. (RQE)	Raz./Med. (RQE)	Med./Mau (RQE)
Rios Montanhosos do Norte	<b>IPtI<sub>N</sub></b>	0.98	0.86	0.60	0.40	0.20
Rios do Norte de Pequena Dimensão	<b>IPtI<sub>N</sub></b>	1.02	0.87	0.65	0.44	0.22
Rios do Norte de Média-Grande Dimensão	<b>IPtI<sub>N</sub></b>	1.00	0.88	0.66	0.44	0.22
Rios do Alto Douro de Média-Grande Dimensão	<b>IPtI<sub>N</sub></b>	1.01	0.83	0.61	0.41	0.20
Rios do Alto Douro de Pequena Dimensão	<b>IPtI<sub>N</sub></b>	1.01	0.85	0.59	0.40	0.20
Rios de Transição Norte-Sul	<b>IPtI<sub>N</sub></b>	1.00	0.86	0.64	0.42	0.21